

Einfluss des Interferon-regulierenden Faktors 5 auf die Abwehr von viralen Infektionen des Zentralen Nervensystems

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
genehmigte
Dissertation

von Katja Finsterbusch
aus Dresden

1. Referent:	Privatdozent Dr. Gerhard Gross
2. Referent:	Professor Dr. Michael Steinert
eingereicht am:	01.10.2012
mündliche Prüfung (Disputation) am:	10.01.2013

Druckjahr 2013

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Tagungsbeiträge

Finsterbusch, K., Hauser, H., Kröger, A., Establishment of mouse models to investigate the contribution of viperin to the host antiviral response. (Poster) 3rd International PhD Symposium, Helmholtz International Research School for Infection Biology, Braunschweig, Germany (2009)

Finsterbusch, K., Hauser, H., Kröger, A., Establishment of mouse models to investigate the contribution of viperin to the host antiviral response. (Poster) Summer School “Molecular Interactions During Infection”, Helmholtz International Research School for Infection Biology, Rügen, Germany (2010)

Finsterbusch, K., Stirnweiss, A., Ksienzyk, A., Hauser, H., Kröger, A., Establishment of mouse models to investigate the contribution of viperin to the host antiviral response. (Poster) EMBO Workshop “Viruses And Innate Immunity”, Dublin, Ireland (2010)

Finsterbusch, K., Kröger, A., Introduction of mouse models to investigate the impact of viperin to the host antiviral response. (Poster) 4th International PhD Symposium, Helmholtz International Graduate School for Infection Research, Braunschweig, Germany (2010)

Finsterbusch, K., Hänsgen, N., Nair, S., Scholübbbers, L., Kröger, A., IRF5 protects mice against VSV infection. (Poster) 5th International PhD Symposium, Helmholtz International Graduate School for Infection Research, Braunschweig, Germany (2011)

Zusammenfassung

Das Interferon- (IFN) System ist die erste Abwehrlinie des Körpers gegen virale Infektionen. Über die Wirkung IFN-stimulierter Gene wird die Replikation und die Ausbreitung der Viren verhindert und eine Immunantwort induziert. Die Familie der Interferon-regulierenden Faktoren (IRFs) ist eine Gruppe von Transkriptionsfaktoren, die an der Regulation vieler Mechanismen der Wirtsabwehr, wie der Induktion von IFNs beteiligt sind. IRF5 induziert die Expression proinflammatorischer Zytokine. Inwiefern IRF5 für die Induktion von Typ I IFNs und deren antivirale Wirkung notwendig ist, ist umstritten (1, 2, 3, 4, 5). In dieser Arbeit sollte daher die Rolle von IRF5 an der antiviralen Wirtsabwehr untersucht werden.

Mit Hilfe von IRF5-defizienten Mäusen konnte gezeigt werden, dass IRF5 eine wichtige Rolle bei der antiviralen Wirtsabwehr spielt. Wildtyp-Mäuse überleben eine intranasale Infektion mit dem Vesikulären Stomatitis-Virus (VSV). IRF5^{-/-} Mäuse hingegen zeigen eine hohe Suszeptibilität gegenüber dieser Infektion. Dabei kommt es zu einer ungehinderten Ausbreitung und Vermehrung von VSV im Gehirn von IRF5^{-/-} Mäusen. Diese verstärkte Replikation von VSV ist jedoch auf das Gehirn beschränkt und konnte in peripheren Organen, wie der Lunge, Leber oder Milz nicht beobachtet werden. Im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen zeigten IRF5^{-/-} Mäuse geringere Konzentration an IFN α im Serum. Dennoch waren sie eingeschränkt in der Lage sowohl in der Lunge, wie auch im Gehirn antivirale Gene wie Ifit2 zu exprimieren. Dies wies darauf hin, dass auch Mechanismen der adaptiven Immunität von IRF5 beeinflusst sein könnten. Naive IRF5^{-/-} Tiere besaßen weniger B- und T-Zellen. Ein wichtiger Mechanismus bei der Bekämpfung einer VSV-Infektion ist die Produktion VSV-neutralisierender Antikörper. Meine Daten zeigten, dass IRF5^{-/-} Tiere einen Defekt in der humoralen Immunabwehr haben. Trotz der Kompensation dieses Defekts durch den adaptiven Transfer von Wildtyp-B-Zellen war die Infektion mit VSV jedoch letal.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass IRF5 einen bedeutenden Einfluss auf die antivirale Wirtsabwehr besitzt. IRF5 ist ein wichtiger Faktor zur Induktion von Typ I IFN, der Entwicklung von B- und T-Lymphozyten und ist an der Produktion neutralisierender Antikörper beteiligt. Die Eliminierung von VSV über IRF5 wird jedoch B-Zell-unabhängig vermittelt.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Antivirale Mechanismen der angeborenen Immunität.....	1
1.1.1	Erkennung von Pathogenen	2
1.1.2	Das Interferon-System	5
1.1.3	Die Familie der Interferon-regulierenden Faktoren.....	9
1.1.4	Interferon-stimulierte Genprodukte mit antiviraler Aktivität	12
1.2	Antivirale Mechanismen der adaptiven Immunität.....	17
1.3	Immunologische Vorgänge im zentralen Nervensystem	19
1.4	Das Vesikuläre-Stomatitis-Virus	21
2	Zielsetzung der Arbeit	25
3	Ergebnisse.....	27
3.1	Generierung einer Rsad2-Reportermaus	27
3.1.1	Generierung des Reporterkonstruktes zur homologen Rekombination in embryonalen Stammzellen.....	27
3.1.2	Generierung genetisch veränderter embryonaler Stammzellen durch homologen Rekombination.....	29
3.1.3	Generierung chimärer Mäuse.....	31
3.2	Charakterisierung der antiviralen Aktivität von IRF5	34
3.2.1	IRF5 ^{-/-} Mäuse sind suszeptibel gegenüber viralen Infektionen	34
3.2.2	IRF5 ist ein wichtiger Faktor zur Inhibierung der Virusreplikation	37
3.2.3	Der Verlust von IRF5 hat keinen Einfluss auf den Zelltropismus von VSV	38
3.2.4	IRF5 ist an der Induktion von IFN beteiligt	41
3.2.5	Einfluss von IRF5 auf die Expression von ISGs	42
3.2.6	Immunmodulatorische Wirkung von IRF5.....	47
3.2.7	IRF5 ^{-/-} Mäuse haben einen Defekt in der humoralen Immunantwort.....	50

3.2.8	Der Defekt in der humoralen Immunantwort ist nicht ursächlich für die letale Infektion mit VSV	51
3.2.9	IRF5-defiziente B-Zellen exprimieren ausreichende Mengen an TNF β ...	53
3.2.10	Nach intracerebraler Infektion sterben IRF5 ^{-/-} Mäuse mit derselben Kinetik wie Wildtyp-Mäuse	54
3.2.11	Die IRF5-Signaltransduktion wird nicht nur über TLR7 vermittelt	55
4	Diskussion	59
4.1	Generierung der Rsad2-TurboFP635-Reportermaus	59
4.2	Charakterisierung des Einflusses von IRF5 auf die antivirale Wirtsabwehr	60
4.2.1	Einfluss von IRF5 auf die angeborene Immunantwort	61
4.2.2	Einfluss von IRF5 auf die adaptive Immunantwort	63
4.2.3	Einfluss sekundärer Effekte durch Dock2-Mutation.....	67
4.2.4	IRF5-vermittelte Signaltransduktion.....	68
5	Material und Methoden	71
5.1	Materialien.....	71
5.1.1	Chemikalien und Enzyme	71
5.1.2	Virusstamm	71
5.1.3	Verbrauchsmittel und sonstige Materialien.....	71
5.1.4	Sterilisation.....	72
5.1.5	Computerprogramme	72
5.1.6	Geräte	73
5.2	Tierexperimentelle Techniken.....	75
5.2.1	Versuchstiere und Haltungsbedingungen.....	75
5.2.2	Abbruchkriterien und Euthanasie.....	76
5.2.3	Adoptiver Transfer	77
5.2.4	Blutentnahme	77
5.2.5	Generierung chimärer Mäuse aus embryonalen Stammzellen.....	78
5.2.6	Mausnarkose.....	78

5.2.7	Perfusion	78
5.2.8	Virusinfektion von Mäusen	79
5.3	Molekularbiologische Techniken.....	79
5.3.1	Agarose-Gelelektrophorese	79
5.3.2	Extraktion von DNA aus Agarosegelen.....	80
5.3.3	Präparation von BAC DNA	81
5.3.4	BAC recombeneering	81
5.3.5	Kultur und Lagerung von <i>E. coli</i> -Zellen.....	81
5.3.6	Herstellung elektrokompenter <i>E. coli</i>	82
5.3.7	Elektroporation von DNA in elektrokompente Bakterien	83
5.3.8	Präparation genomischer DNA	83
5.3.9	Isolierung genomischer DNA aus Schwanzspitzen-Biopsien	84
5.3.10	Polymerase-Kettenreaktion.....	84
5.3.11	Restriktion von DNA	86
5.3.12	Isolierung von RNA.....	86
5.3.13	Reverse Transkription (cDNA-Synthese).....	87
5.3.14	Quantitative Real-Time PCR	88
5.3.15	Southern Blot	89
5.4	Zellkulturtechniken	91
5.4.1	Kultivierung von Zellen.....	91
5.4.2	Lagerung von Zellen.....	93
5.4.3	Auftauen von Zellen	93
5.4.4	Passagieren von Zellen	93
5.4.5	Stabile Transfektion der mES-Zellen	94
5.4.6	Selektion der neomycinresistenten ES-Zellklone	94
5.4.7	Isolierung von ES-Zellklonen.....	95
5.4.8	IFN β -Stimulation von Zellen.....	95

5.4.9	Zellzahlbestimmung	95
5.5	Immunologische und virologische Techniken	96
5.5.1	Durchflusszytometrie und Zellsortierung	96
5.5.2	Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	97
5.5.3	Isolierung von B-Zellen	98
5.5.4	Isolation primärer Immunzellen aus der Maus	98
5.5.5	Bestimmung von Virustitern	100
5.5.6	VSV-Neutralisationstest	100
5.6	Histologische Techniken	101
5.7	Statistische Auswertung	102
6	Literaturverzeichnis	103
7	Appendix	i

1 Einleitung

In den Industriestaaten ist die Zahl der Bakterien-, Parasiten-, Pilz- und Viren-Erkrankungen vor allem Dank verbesserter Hygiene- und Sanitärmaßnahmen und der Entwicklung von Impfstoffen und Antibiotika seit dem letzten Jahrhundert deutlich zurückgegangen. Dennoch tauchen immer wieder neue Erreger, wie das humane Immundefizienzvirus (HIV) und SARS, auf - oder altbekannte wie das Grippevirus in veränderter Form. Sorge bereitet weiterhin die zunehmende Medikamenten-Resistenz vieler Erreger. So sind Infektionserkrankungen auch heute noch laut der Weltgesundheitsorganisation WHO für ein Drittel bis ein Viertel aller vorzeitigen Todesfälle weltweit verantwortlich. In den meisten Entwicklungsländern sind sie sogar Todesursache Nummer Eins (6, 202).

Der Erforschung der körpereigenen Immunabwehr gegen Krankheitserreger kommt daher eine wichtige Aufgabe zu, vor allem dann, wenn Pathogene Mechanismen entwickelt haben, dieses effektive Abwehrsystem zu unterlaufen.

1.1 Antivirale Mechanismen der angeborenen Immunität

Im Laufe der Evolution hat sich das Immunsystem höherer Organismen gut gegen Viren und andere Pathogene gerüstet. Voraussetzung für eine effektive Abwehr und Eliminierung von Viren ist das Zusammenspiel der angeborenen (innaten) und der erworbenen (adaptiven) Immunantwort. Die angeborene Immunität bildet anatomische (Haut und Schleimhäute), physiologische (Temperatur, niedriger pH, chemische Mediatoren), phagozytische und inflammatorische Barrieren aus und dient der ersten, schnellen Abwehr. Sie kann jedoch Krankheitserreger nicht spezifisch erkennen und keinen gezielten Schutz gegen erneute Infektionen entwickeln. Ein initialer Schritt der innate Immunantwort ist die Induktion von Typ I Interferon (IFN), eine Gruppe von immunologischen Botenstoffen, die zur Expression von Genen mit direkter oder indirekter antiviraler Aktivität, den sogenannten Interferon-stimulierten Genen (ISGs), führt (vgl. 1.1.2). Des Weiteren ist eine Vielzahl verschiedener Immunzellen an dem effizienten Schutz vor Erreger beteiligt. Dazu gehören insbesondere die Antigen-

präsentierenden Zellen (APCs), wie Dendritische Zellen (DCs) und Makrophagen, Mastzellen, Monozyten, natürliche Killerzellen (NK-Zellen) und neutrophile Granulozyten (7).

1.1.1 Erkennung von Pathogenen

Um den Organismus wirksam vor Krankheiten zu schützen, muss das Immunsystem zunächst das Pathogen erkennen, welches die Zelle infiziert hat. Dabei werden Strukturen, die vielen Mikroorganismen gemein sind, die so genannten Pathogen-assoziierten molekularen Muster (PAMP) von genetisch determinierten Mustererkennungsrezeptoren (PRR) erkannt. Dies führt dann zur Induktion einer Signalkaskade, die in der Induktion von IFN und proinflammatorischen Zytokinen resultiert. Typische PAMPs sind mannosereiche Oligosaccharide, Proteoglykane und Lipopolysaccharide (LPS) aus der Zellwand Gram-negativer Bakterien und virale oder prokaryotische Nukleinsäuren. Zu den PRR gehören unter anderem die RIG-I (*retinoic acid-inducible gene 1*) ähnlichen Helikasen (RLR) und die Toll-ähnliche Rezeptoren (TLR; 7; vgl. Abb. 1).

RIG-I-ähnliche Helikasen

Die beiden RLR RIG-I und MDA5 (*melanoma differentiation-associated gene 5*) sind zytosolische RNA Helikasen, die an der Erkennung viraler Infektionen beteiligt sind (8). Es wurde nachgewiesen, dass RIG-I und MDA5 selektiv aktiviert werden können. Durch RIG-I wird spezifisch 5'-Triphosphat (5'PPP) ss (*singl-stranded*) RNA sowie kurze ds (*double-stranded*) RNA als Fremd-RNA erkannt (9). Der Ligand von MDA5 hingegen ist lange dsRNA (10). Sie induzieren die Produktion von Typ I IFN und proinflammatorischen Zytokinen über das Adapterprotein IPS-1 (*IFN β promoter stimulator 1*; auch CARDIF, MAVS und VISA genannt) unabhängig vom MyD88 (*myeloid differentiation primary response gene 88*) -Signalweg (11, 12, 13, 14).

RIG-I und MDA5 interagieren mit IPS-1, das in die äußere Membran der Mitochondrien integriert ist, durch Wechselwirkung der CARD Domänen (*caspase*

activation and recruitment domains), wodurch weitere Adaptoren der Signalkaskade rekrutiert werden (13). Es wurde gezeigt, dass Moleküle der TRAF (*TNF (tumor necrosis factor) receptor-associated factor*) Familie an der Signaltransduktion beteiligt sind. TRAF3 interagiert direkt mit dem TIM (*TRAF-interacting motif*) in IPS-1 (15). Des Weiteren wurde eine Interaktion mit TRAF2 und 6 nachgewiesen (14). TRAF Adaptormoleküle leiten das Signal an weitere Proteinkinasen der IKK (IkB (*inhibitor of NF- κ B (nuclear factor κ B)* Kinase) Familien Moleküle weiter, welche für die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren Interferon-regulierender Faktor (IRF) 3 und IRF7 sowie NF- κ B wichtig sind. Der IKK-Komplex, bestehend aus IKK α , IKK β und IKK γ (auch NEMO), phosphoryliert IkB, welcher vom Proteasom degradiert wird und die Translokation von NF- κ B in den Nukleus ermöglicht (16). Parallel dazu aktivieren die Adaptoren TBK1 (*TRAF family member-associated NF- κ B activator-binding kinase 1*) und IKK ϵ die signalabhängige Phosphorylierung von IRF3 und IRF7, welche ein funktionales Homo- bzw. Heterodimer bilden (17). Die aktiven Formen von NF- κ B und IRF-Dimeren induzieren im Nukleus die Transkription von Typ I IFN und proinflammatorischen Zytokinen.

Toll-ähnliche Rezeptoren

Zurzeit sind 13 TLRs bekannt, wobei TLR1 bis 7 und 9 sowohl in der Maus als auch im Menschen vorkommen, TLR8 und 10 nur im Menschen funktional sind und TLR11 bis 13 nur in der Maus nachgewiesen wurden. TLR1, 2, 4, 5, 6 und 11 werden an der Zelloberfläche vieler Zellen exprimiert. TLR3, 7, 8, 9 und 13 sind nur in endosomalen Kompartimenten lokalisiert (18, 19, 20). Die an der Erkennung viraler Liganden beteiligten TLRs sind in Tabelle 1 dargestellt.

Das Binden von PAMPs an die Leucin-reiche Wiederholungsdomäne initialisiert eine Konformationsänderung des TLR, so dass die TIR- (*Toll/Interleukin-1 receptor*) Domäne-enthaltenden Adapterproteine (TIRAP), wie MyD88 und TRIF (*TIR-domain-containing adapter-inducing IFN β*), an die TIR Domäne des TLR rekrutiert werden können, was die intrazelluläre Signaltransduktion startet (vgl. Abb. 1; 23, 24, 25, 26, 27). Mit Ausnahme von TLR3 nutzen alle TLRs die MyD88-abhängige Signalkette (23). Dabei bindet MyD88 die Serin/Threonin Interleukin-1-Rezeptor-assoziierte

Kinasen IRAK1 und IRAK4 über die homophile Interaktion der Todesdomänen an den Rezeptorkomplex (28). Diese werden daraufhin autophosphoryliert, dissoziieren vom Rezeptor, assoziieren mit dem zytosolischen Adapterprotein TRAF6 und werden degradiert (23). Schließlich aktiviert TRAF6 den IKK-Komplex, Januskinasen (JAK) und p38 über das Adapterprotein TAK1 (*transforming growth factor- β -activated kinase 1*), was wiederum zur Aktivierung von NF- κ B und AP-1 (*activating protein-1*) führt (23, 24, 25). Dies induziert die Transkription von Effektormolekülen des angeborenen Immunsystems, den proinflammatorischen Zytokinen.

Tabelle 1: Virale Antigenerkennung durch Toll-ähnliche Rezeptoren (adaptiert nach 21, 22)

Ligand	TLR	TLR-vermittelter Effekt
CpG DNA	TLR9	NF κ B-Aktivierung
dsRNA	TLR3	IRF3/7-Aktivierung
Hämagglutininprotein	TLR2	Proinflammatorische Zytokine
Hüllprotein	TLR4	Type I IFN und ISGs
ss RNA	TLR7/8/13	

Der von TLR3 und 4 verwendete MyD88-unabhängige Signalweg wird über TRIF vermittelt. Dabei wird IRF3 über TBK1 phosphoryliert, was Typ I IFN, vor allem IFN β , induziert (29, 30, 31). Wie auch beim MyD88-abhängigen Signalweg wird parallel TRAF6 aktiviert, was letztendlich zur Aktivierung von NF- κ B und AP-1 führt. Zusätzlich vermittelt der MyD88-TRAF6-IRAK-Komplex die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren IRF5 und IRF7, was zur Produktion weiterer Typ I IFN, vor allem IFN α , führt (32, 33). Außerdem interagiert IRF1 mit MyD88. Das so aktivierte IRF1 transloziert in den Nukleus und induziert dort unter anderem IFN β , iNOS (*inducible nitric oxide synthase*) und Interleukin (IL)12p35 (34). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass IRF1 IFN-unabhängig ISGs induzieren kann (35).

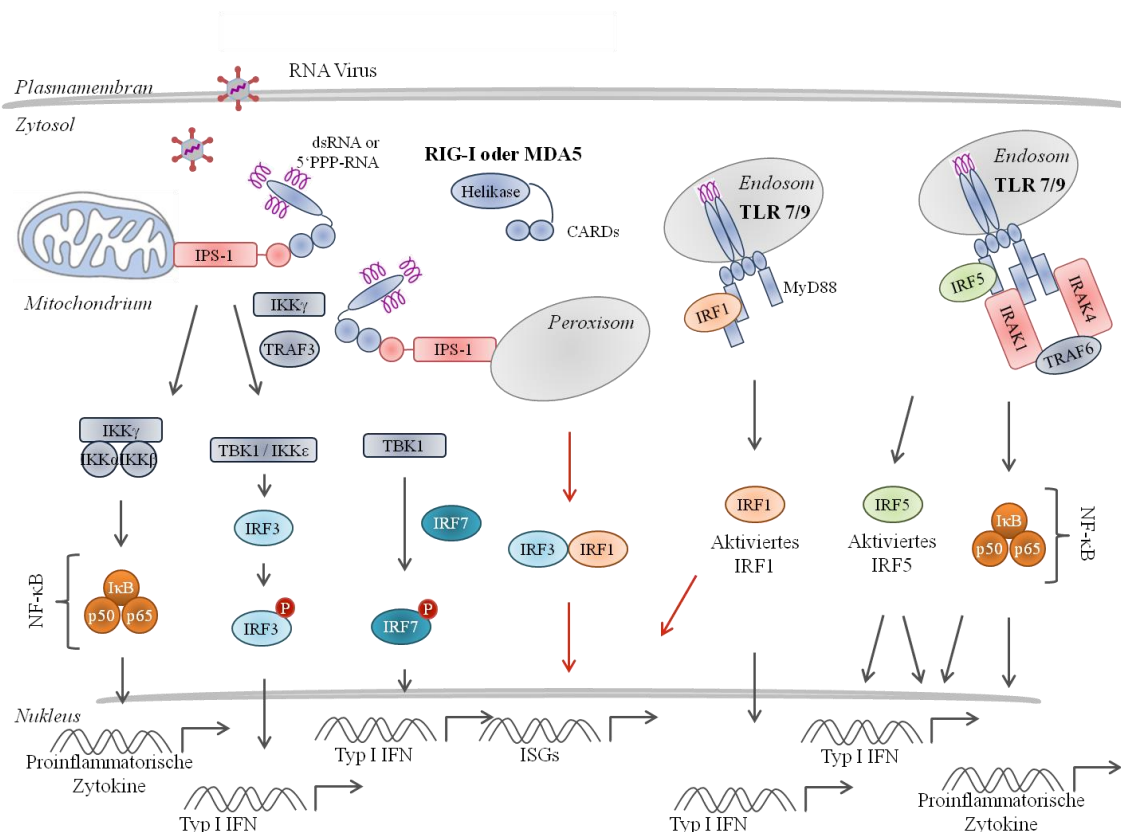


Abb. 1: Erkennung von Viren mit RNA-Genom (adaptiert nach 62, 166)

RIG-I und MDA5 detektieren virale RNA. Dabei interagieren sie mit IPS-1 an den Mitochondrien, welches dann Signalkaskaden induziert, die zur Aktivierung und nuklearen Translokation von NF-κB, IRF3 und IRF7 führen. Daraufhin kommt es zur Expression proinflammatorischer Zytokine bzw. Typ I IFN. IRF1 interagiert im TLR7/9-Signalweg mit MyD88 und aktiviert somit die Induktion von IFNβ, iNOS, IL12p35 und ISGs. Ebenfalls nach TLR7/9-Aktivierung interagiert IRF5 mit MyD88 und TRAF6. Das dadurch aktivierte IRF5 transloziert in den Nukleus, wo es, wie auch NF-κB, die Expression proinflammatorischer Zytokine und Typ I IFN induziert. Des Weiteren werden ISGs IFN-unabhängig über IRF1 und IRF3, aktiviert durch peroxisomales IPS-1, induziert.

1.1.2 Das Interferon-System

1935 entdeckten M. Hoskins, G. M. Findlay und F. MacCallum bei Arbeiten am Gelbfiebertvirus das Phänomen der Interferenz: Versuchstiere, die mit avirulenten Virus geimpft wurden, waren in den folgenden 24 Stunden vor den Folgen der Infektion mit dem virulenten Stamm geschützt. A. Isaacs und J. Lindenmann konnten 1957 zeigen, dass IFN für diesen Effekt verantwortlich sind (23).

IFN sind artspezifische, induzierbare und pleiotropische Zytokine, welche die primäre, unspezifische Abwehr gegen Infektionen bilden und somit bei Entzündungsprozessen und bei der immunologischen Überwachung von noch nicht befallenen Zellen beteiligt

sind. Sie vermitteln ihre Aktivität über die Bindung an IFN-spezifische Rezeptoren in den Zielzellen, was zur Expression zahlreicher Gene führt. So spielen sie auch bei der adaptiven Immunabwehr, der Regulation der Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Apoptose eine wichtige Rolle.

Aufgrund unterschiedlicher Genloci und Aminosäuresequenzen sowie ihrer Signaltransduktion über spezifische Rezeptoren unterscheidet man drei Gruppen von IFN: Typ I IFN, Typ II IFN und Typ III IFN (vgl. Abb. 2). Diese sollen nachfolgend näher beschrieben werden.

Typ I Interferon

Die Familie der Typ I IFN umfasst IFN α , welches in 13 verschiedene Subtypen unterteilt werden kann, IFN β , IFN δ , IFN ϵ , IFN κ , IFN τ und IFN ω . Typ I IFN weisen eine hohe homologe Strukturen auf. Die Zytokine unterscheiden sich jedoch in ihrem Expressionsprofil, den regulatorischen Stimuli und den produzierenden Zelltypen (24). Die Gene liegen geclustert auf dem Chromosom 9 in Menschen bzw. Chromosom 4 in Mäusen (25, 26). In Zellkultur sind praktisch alle Zellen in der Lage, nach bakterieller oder viraler Infektion Typ I IFN zu exprimieren. Plasmazytoide dendritische Zellen (pDCs) sind jedoch darauf spezialisiert nach Virusinfektionen besonders große Mengen an Typ I IFN zu produzieren (27, 28, 29). Alle Typ I IFN-Subtypen binden an einen Oberflächenrezeptor, den IFN α -Rezeptor-Komplex (IFNAR), der aus den zwei Untereinheiten IFNAR1 und IFNAR2 gebildet wird. Er wird von den meisten Zelltypen exprimiert (30). Mäuse ohne funktionellen IFNAR sind extrem suszeptibel gegenüber viralen Infektionen (31, 32, 33).

Die Typ I IFN binden autokrin oder parakrin an den IFNAR, was eine Konformationsänderung des Rezeptors initiiert und zur Aktivierung der Tyrosinkinase (TYK) 2 und Januskinase (JAK) 1 führt (vgl. Abb. 2). Dies aktiviert den PI3K (*phosphatidylinositol 3-kinases*), MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) - oder den klassischen JAK-STAT- (*signal transducers and activators of transcription*) Signalweg, der im Weiteren näher erklärt werden soll. Die Dimerisierung und Autophosphorylierung des Rezeptors und die Aktivierung von JAK1 und TYK2 resultiert in einer Phosphorylierung zweier Transkriptionsfaktoren aus der STAT-

Familie. Das Heterodimer aus STAT1 und STAT2 transloziert in den Zellkern und bildet mit dem IRF9 den IFN-stimulierenden Genfaktor 3 (ISGF3). ISGF3 erkennt im Promotorbereich von vielen ISGs das IFN-stimulierte Antwortelement (ISRE) und initiiert deren Transkription (34). Des Weiteren ist die Bildung anderer Homo- und Heterodimere aus STAT-Molekülen zur Signalweiterleitung beschrieben (35, 36, 37, 38, 39). Die Expression von Typ I IFN ist streng reguliert, da sich eine dauerhafte Ausschüttung von Typ I IFN negativ auf den Wirtsorganismus auswirken kann (Review siehe 40). In adulten Tieren kann es bei unverminderter Ausschüttung von Typ I IFN zur Induktion von Autoimmunerkrankungen kommen (41).

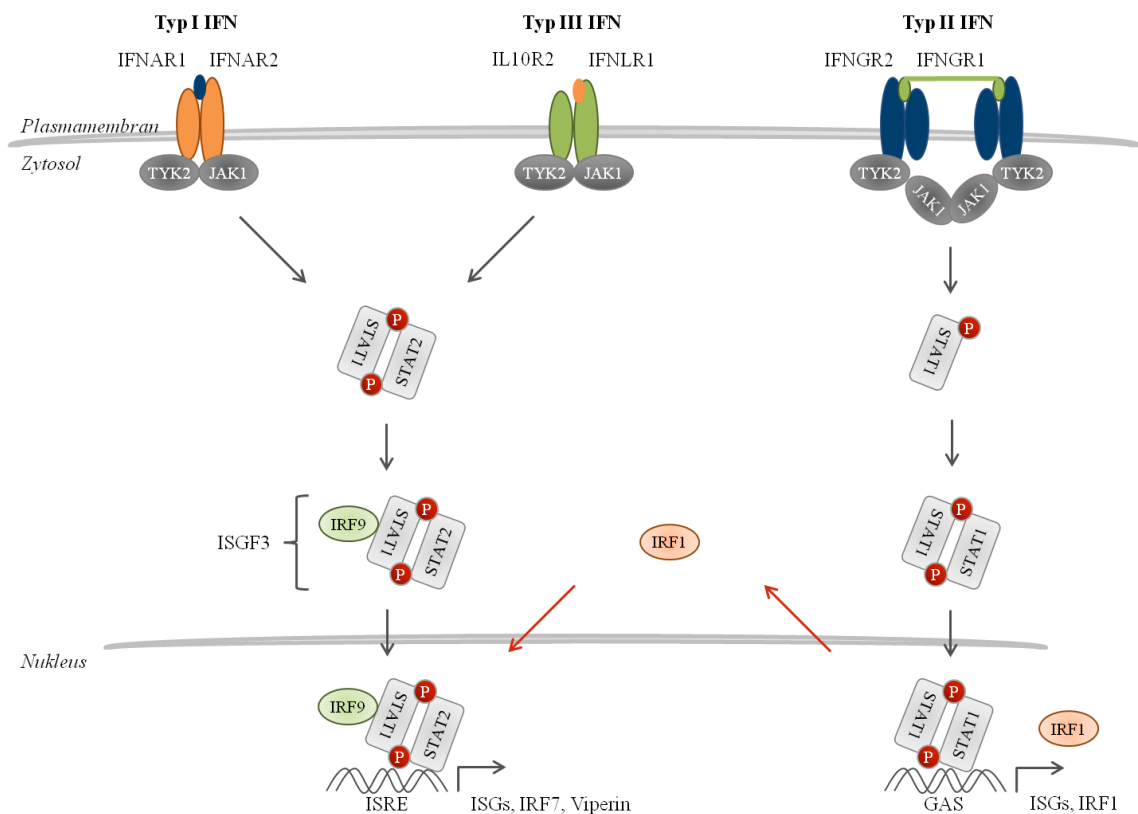


Abb. 2: Interferon-Rezeptor-Signalkaskade (adaptiert nach 78)

IFN können in Typ I, Typ II und Typ III unterteilt werden, wobei ihre Wirkung durch drei Rezeptorkomplexe vermittelt wird: ein Heterodimer aus IFNAR1 und IFNAR2 bindet Typ I IFN, der IL10R2 assoziiert mit dem IFNLR um IFNλs zu binden und ein Tetramer aus zwei IFNGR1-Ketten und zwei IFNGR2 bindet ein Dimer des Typ II IFN. Nach der Bindung des Liganden wird die Signalweiterleitung über JAK1 und TYK2 initialisiert. Daraufhin werden STATs rekrutiert und phosphoryliert, die je nach Signalweg mit Kofaktoren interagieren. Diese Komplexe translozieren in den Nukleus, binden an ISRE- oder GAS-Elemente und führen zur Induktion von ISGs. Viele Viren haben Strategien entwickelt, der Induktion von IFN zu entgehen. In diesem Fall können ISGs, wie Viperin direkt über IRF1 induziert werden.

Typ I IFN können die Synthese von über 300 zellulären Proteinen modulieren. Diese sogenannten ISGs vermitteln unter anderen direkt oder indirekt eine effektive Immunantwort gegen Viren (vgl. 1.1.4; 42, 43). Weiterhin hemmen ISGs die Expansion infizierter Zellen und machen sie gleichzeitig empfänglich für apoptotische Stimuli (44, 45, 46). Zusätzlich führen sie zur Aktivierung von Effektorzellen des angeborenen Immunsystems, wie DCs, Makrophagen und NK-Zellen. Durch seinen Einfluss auf die Reifung von DCs sowie deren Potential, Antigene zu präsentieren, wird Typ I IFN auch als Bindeglied zwischen angeborener und adaptiver Immunantwort betrachtet.

Aufgrund dieses Wirkungsspektrums werden IFN auch therapeutisch eingesetzt. So wurde zum Beispiel beobachtet, dass IFN β eine verzögernde Wirkung auf den Krankheitsverlauf der schubförmigen Form der Autoimmunkrankheit Multiple Sklerose besitzt (47, 48, 49).

Viele Viren haben jedoch Mechanismen entwickelt der antiviralen Aktivität von IFN zu entgehen, um ihre eigene Replikation zu ermöglichen (50). Sie umgehen dieser Abwehrlinie, indem sie die IFN-Synthese oder Signaltransduktion blocken und damit die Amplifikation der IFN-Antwort und Induktion von ISGs hemmen oder die induzierten Proteine inhibieren (51).

Typ II Interferon

Zu den Typ II IFN gehört ausschließlich IFN γ . Obwohl dieses Protein keine strukturellen Homologien zu Typ I IFN aufweist, wurde es aufgrund seiner antiviralen Wirkung in die Gruppe der IFN eingeordnet (52). Das kodierende Gen des Typ II IFN wird auf Chromosom 12 in Menschen und 10 in Mäusen kodiert. IFN γ bindet an den IFN γ -Rezeptor (IFNGR), der ebenfalls auf kernhaltigen Zellen exprimiert wird (Abb. 2; 53). Wie auch bei Typ I IFN bewirkt die Ligandenbindung eine Konformationsänderung des Rezeptors, welche die Aktivierung von TYK2 und JAK1 initiiert (vgl. Abb. 2). Dies führt zur Phosphorylierung von STAT1. Aktivierte STAT1-Homodimere translozieren in den Nukleus und binden an GAS- (*IFN γ activated sites*) Elemente in den Promotorregionen von IFN γ -stimulierten Genen und induzieren deren Transkription.

Während Typ I IFN direkt von Viren induziert werden können, wird die Sekretion von IFN γ vor allem durch mitotische oder antigene Stimuli induziert. Es wird hauptsächlich von aktivierten T- oder NK-Zellen produziert und ist notwendig für die Aktivierung von Makrophagen sowie die Differenzierung zu CD4⁺ TH1-Zellen (54). Neben diesen immunstimulatorischen und immunmodulatorischen Funktionen ist IFN γ an der Bekämpfung viraler und intrazellulärer bakterieller Infektionen und an der Tumorerüberwachung beteiligt (55, 56).

Typ III Interferon

Die Mitglieder der IFN λ - (IFN λ 1, 2, 3) bzw. IL28/29-Familie (IL29, IL28A und IL28B) stellen die dritte Gruppe, die Typ III IFN, dar. IFN λ s werden durch geclustert vorliegende Gene auf Chromosom 19 im Menschen und Chromosom 7 in Mäusen kodiert. Wie Typ I IFN werden sie nach viralen Infektionen produziert und zeigen antivirale Wirkungen. Sie unterscheiden sich jedoch strukturell von Typ I IFN und binden einen spezifischen Rezeptor, der aus dem IFNLR1 (IFN λ 1-Rezeptor, auch IL28R α) und dem IL10R2 (auch IL10R β) besteht. Die IL10R β -Untereinheit wird auch von IL10, IL22 und IL26 zur Signaltransduktion genutzt. Nach Bindung von IFN λ an den entsprechenden Rezeptor werden dieselben Moleküle zur Signaltransduktion genutzt, die auch durch Typ I IFN induziert werden können (57, 58).

1.1.3 Die Familie der Interferon-regulierenden Faktoren

Zu den bestcharakterisiertesten Vermittlern des PRR-Signals zum Nukleus gehören NF- κ B und die Vertreter der Familie der Interferon-regulierende Faktoren (IRFs). IRFs spielen eine zentrale Rolle in der Regulation vieler Bereiche des angeborenen und erworbenen Immunsystems. Daneben sind sie auch an der Regulation der Zellproliferation und Onkogenese beteiligt.

Bislang sind 9 Mitglieder dieser Familie von Transkriptionsfaktoren in Säugetieren bekannt (59, 60). Sie verbindet ein N-terminales, 120 Aminosäuren umfassendes Helix-Turn-Helix-Motiv mit 5 konservierten Tryptophanresten, welche jeweils durch

10-18 Aminosäuren getrennt sind (60). Der N-Terminus fungiert als DNA-Bindedomäne, mit der DNA Sequenzen ähnlich den ISREs im Promotorbereich verschiedenster Gene erkannt werden (61). Trotzdem regulieren die einzelnen IRF-Mitglieder nicht dasselbe Repertoire an Genen und können sowohl als transkriptioneller Aktivator (IRF1, IRF3, IRF5 und IRF9), Repressor (IRF8) oder beides (IRF2, IRF4 und IRF7) agieren. Diese Unterschiede in der Spezifität der IRFs hängen mit der Expression in verschiedenen Zelltypen und der Interaktion weiterer Bindungspartner zusammen (60).

IRF3 und IRF7 sind maßgeblich an der Induktion von Typ I IFN beteiligt, obwohl auch IRF1, IRF5 und IRF8 diese Funktion ausüben. IRF1, IRF3, IRF4, IRF5 und IRF8 induzieren zusätzlich die Expression von proinflammatorischen Zytokinen und weiterer Gene. Neben dieser Aufgabe in der angeborenen Immunität sind IRF1, IRF2, IRF4 und IRF8 an der Entwicklung verschiedener Immunzellen beteiligt. Ferner übernehmen IRF1, IRF3, IRF5 und IRF8 Aufgaben bei der Kontrolle des Zellwachstums und Onkogenese (62).

Der Interferon-regulierende Faktor 5

IRF5 ist nach einer Virusinfektionen an der Induktion proinflammatorischer Zytokine, wie TNF, IL6, IL12 und IL23 beteiligt und spielt so eine wichtige Rolle bei der angeborenen Immunabwehr. Die verminderte Induktion von proinflammatorischen Zytokinen ist ursächlich für eine erhöhte Resistenz von IRF5^{-/-} Mäusen gegenüber LPS induzierten toxischen Schock (3). IRF5 wird im Menschen auf Chromosom 7 und in der Maus auf Chromosom 6 kodiert. Humanes IRF5 wird in verschiedenen Splicevarianten exprimiert, die spezifisch für Zelltypen, zellulärer Lokalisation und unterschiedlicher Regulation und Funktion sind (63). Genetische Polymorphismen im IRF5-Gen führen zur Expression verschiedener einzigartiger Isoformen oder höherer Expressionen an IRF5-mRNA und sind mit Autoimmunkrankheiten, wie Systemischer Lupus Erythematoses (SLE), rheumatoider Arthritis, Sjögrens Syndrom, Multipler Sklerose und Inflammatory Bowel Disease assoziiert (64, 65, 66, 67 , 68, 69, 70). IRF5 wird konstitutiv in lymphoiden Organen (Milz, Lymphknoten und Knochenmark) und in Lymphozyten, vor allem Monozyten wie B-Zellen, pDCs, Makrophagen und NK-

Zellen, aber nicht in T-Zellen exprimiert. Im geringeren Maße findet man es auch in den Nieren, im Gehirn, der Lunge, dem Pankreas, den Muskeln, der Plazenta, der Prostata, allerdings nicht im Thymus (71). Type I IFN können die IRF5 Expression in anderen Zellen und Geweben induzieren (71). Interessanterweise wird IRF5 Virus-spezifisch induziert. Die Infektion mit dem Newcastle Disease Virus (NDV), Vesikuläre-Stomatitis-Virus (VSV) und dem Herpes-Simplex-Virus 1 führt zur Induktion und Aktivierung von IRF5, während das Sendaivirus (SV) die Expression nicht beeinflusst (2).

IRF5 wird nicht nur ein Einfluss auf die Regulation des Zellwachstums und Apoptose zugeschrieben, sondern in *in vivo*-Experimenten konnte auch gezeigt werden, dass IRF5^{-/-} Mäuse susceptibler gegenüber viraler Infektionen sind (4). Des Weiteren zeigen IRF5^{-/-} Mäuse reduzierte Serumlevel an Typ I IFN, was ihre Rolle in der antiviralen Immunabwehr unterstreicht (2, 5). Diese Hypothese wird mittlerweile jedoch kontrovers diskutiert (3, 5). An einem viszeralen Leishmaniose-Mausmodell konnte außerdem der Einfluss von IRF5 auf die T-Zell Funktion untersucht werden. Paun und Mitarbeiter konnten zeigen, dass die spezifische TH1 Antwort in IRF5^{-/-} Mäusen nach *Leishmania donovani*-Infektion vermindert ist, was zu einer erhöhten Parasitenvermehrung in der Leber führte. Die eingeschränkte TH1 Antwort ist, zumindest teilweise, auf die verringerte IL12p35-Geninduktion in IRF5-defizienten DCs zurückzuführen. Da jedoch gezeigt werden konnte, dass die Granulomas in den Lebern von IRF5^{-/-} Mäusen kleiner sind, was durch eine erhöhte IL4 und IL10 Antwort nach *L. donovani*-Infektion bedingt ist, lässt sich die Vermutung anstellen, dass IRF5 eine TH1 Differenzierung durch die Inhibierung alternativer Differenzierungswege der T-Zellen, ähnlich wie IRF1 und 2, inhibiert (72). Die Funktion von IRF5 in der TH1 und TH17 Differenzierung wurde zusätzlich bei der Polarisierung von Makrophagen zum M1 Phänotyp untersucht. IRF5 begünstigt ein IL12^{high}IL23^{high}IL10^{low} Zytokine-Profil, was mit jenem von M1 Makrophagen assoziiert ist. Diese Makrophagen steuern daraufhin die Umgebung, welche für eine wirksame TH1 und TH17 Antwort notwendig ist (73). Neben dem positiven Einfluss auf die T-Zell-Proliferation und -Aktivierung der TH1 und TH17 Antwort konnte keine Induktion der TH2- oder Treg-Differenzierung gezeigt werden. Jedoch zeigen IRF5^{-/-} Mäuse zusätzlich einen veränderten B-Zell-Phänotyp, manifestiert durch eine altersabhängige Expansion

CD19⁺B220⁻ B-Zellen, einer Splenomegalie und einer verminderten Blimp-1 Expression und Anzahl von Plasmazellen (74).

1.1.4 Interferon-stimulierte Genprodukte mit antiviraler Aktivität

Als Zytokine sind die IFN zur Initiierung der antiviralen Immunantwort wichtig. Sie führen zur Expression von hunderten ISGs (75). Von der Mehrzahl der Genprodukte ist die Funktion nicht bekannt. Des Weiteren sind nur einige der ISGs direkt an der Etablierung eines antiviralen Status in der Zelle beteiligt. Viele kodieren direkt für PRR oder Transkriptionsfaktoren aus der Signalkaskade des IFN-Rezeptor-Signalweges, die die IFN-Antwort amplifizieren. Dennoch gibt es ISGs, die für Proteine mit direkter antiviraler Wirkung kodieren, wie Ifit (*IFN-induced proteins with tetratricopeptide repeats*), ISG15 (IFN-stimuliertes Gen mit 15 kDa), die GTPase Mx1/2 (Myxovirus-Resistenzgen 1/2), PKR (Proteinkinase R) und Viperin (Virus inhibierendes Protein, Endoplasmatisches Retikulum-assoziiert, IFN-induzierbar; 76, 77, 78).

Das antivirale Protein Viperin

Viperin wurde als induziertes Gen in Fibroblasten nach einer humanes Cytomegalovirus- (HCMV) Infektion entdeckt (79). Normalerweise wird Viperin konstitutiv in sehr geringem Maße exprimiert. Jedoch konnte mittels Genexpressionsanalysen gezeigt werden, dass Viperin durch viele verschiedene Stimuli, wie Typ I, II und III IFN, verschiedene Viren (vgl. Tabelle 2), LPS, dem dsRNA-Analog poly(I:C) und dsDNA-Heteropolymer (poly-dA:dT) in verschiedenen Zelltypen zu einem der höchst induzierten Genen gehört (80, 81, 82). Viperin ist ein hoch konserviertes Protein und kann in vielen Organismen vom Knochenfisch bis zum Säugetier nachgewiesen werden (83).

Das murine Viperin-Gen kodiert auf dem Chromosom 12 für ein 361 Aminosäuren großes Protein mit einer Molekularmasse von 42 kDa. Aufgrund seiner Strukturmerkmale wird Viperin zu der SAM-abhängigen radikal Enzym Superfamilie gezählt (vgl. Abb. 3; 84). Deshalb wird Viperin auch Rsad2 (radical SAM domain-

containing 2) genannt. Charakteristisch hierfür sind seine 4 Radikal-SAM-Domänen. Die erste dieser Domänen beinhaltet ein konserviertes CX3CX2C-Motiv, was an der Bindung von Eisen-Sulfur-Clustern und damit an der Bildung eines 5'-Deoxyadenosyl-Radikals beteiligt ist, die enzymatische Reaktionen, wie die Katalyse der ATP-Hydrolyse, initiieren können (85, 86). Allerdings ist bisher keine dieser spezifischen Enzymaktivitäten für Viperin beschrieben worden. Des Weiteren besitzt Viperin eine zwischen den verschiedenen Spezies variable N-terminale amphipathische α -Helix, welche Viperin ermöglicht, an Membranen zu binden und damit an der intrazellulären Lokalisation des Proteins beteiligt ist (87, 88). So ist Viperin am endoplasmatischen Retikulum (ER) und andererseits an Fettvakuolen (*lipid droplets*) lokalisiert (89). Der hoch konservierte C-Terminus ermöglicht die Dimerisierung des Proteins, was bei Überexpression zum Aufbau kristalloider ER führt – einer Konformationsänderung der ER Membran in eine gitterähnliche Struktur (90).

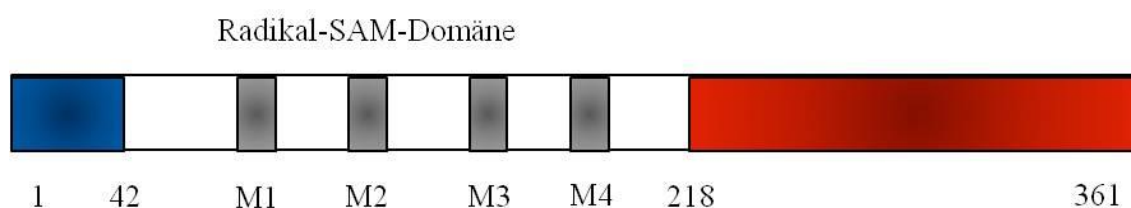


Abb. 3: Schematische Darstellung der Viperin-Struktur (adaptiert nach 203)

Reste 1-42 ergeben die N-terminale amphipathische α Helix (blau). Sie ist notwendig zur Lokalisation an die zytosolische Seite des ER und Fettvakuolen. Die Radikale-Sam-Domäne (Reste 77-209) umfasst 4 konservierte Motive (M1-M4, grau). Sie beinhalten das Fe-S-Cluster Bindungsmotiv CX3CX2C und ist an der antiviralen Aktivität beteiligt. Der konservierte C-Terminus ist notwendig zur Dimerisierung (rot).

Erste Charakterisierungen zeigten, dass Viperin die Vermehrung von HCMV stört (83). Inzwischen konnte in Zellkulturexperimenten diese Funktion für ein breites Spektrum an Viren, darunter ein Alphavirus (Sindbisvirus), Flaviviren (Denguevirus (DENV), West-Nil-Virus (WNV), ein Hepacivirus (Hepatitis-C-Virus (HCV)), Influenza-A-Virus, ein Lentivirus (HIV), ein Respirivirus (SV) und ein Vesiculovirus (VSV), gezeigt werden (91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98). *In vivo* konnte dies mit Hilfe einer Viperin-knock-out-Maus für WNV bestätigt werden. Diese Tiere sind anfälliger gegenüber der Infektion und haben höhere Viruskonzentrationen im zentralen und peripheren Nervensystem (99). Dabei ist der Mechanismus der antiviralen Aktivität scheinbar sehr komplex und noch nicht vollständig verstanden.

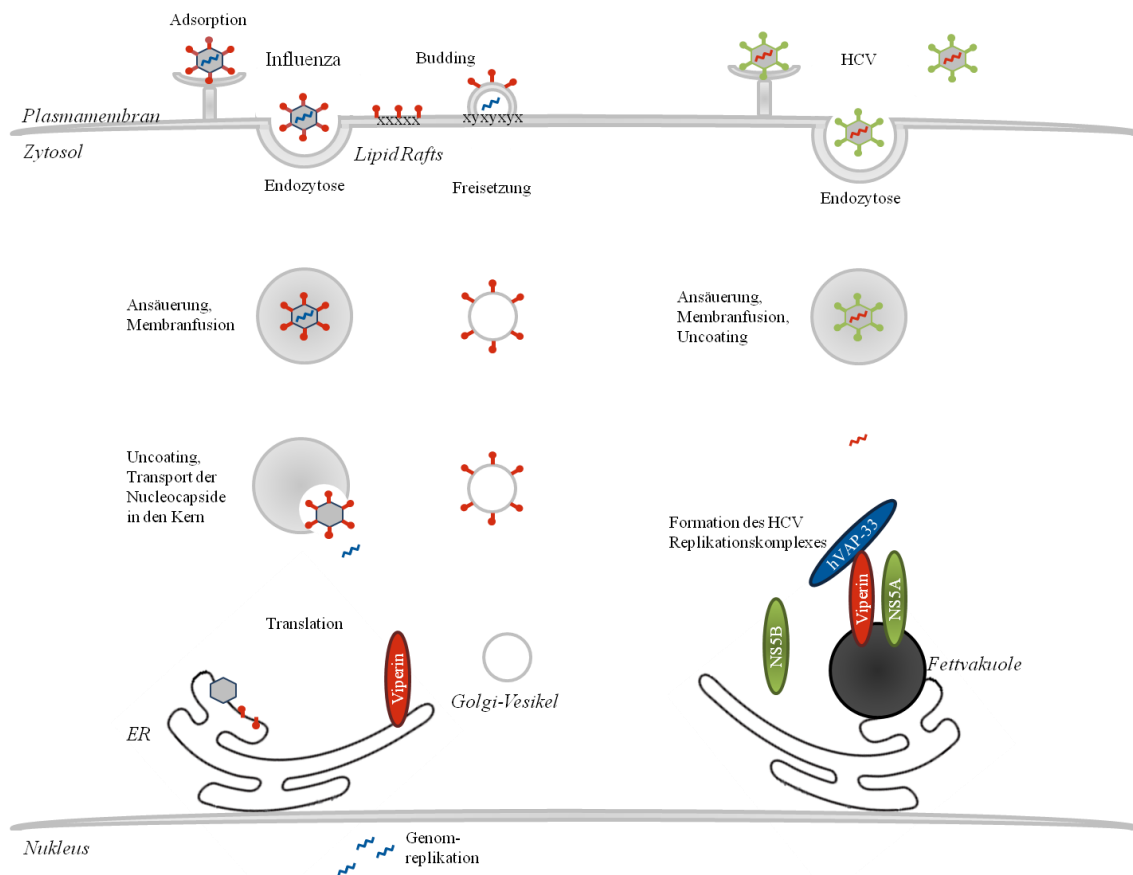


Abb. 4: Übersicht über die antiviralen Wirkungen von Viperin (adaptiert nach 203)

Viperin hemmt das Abknospen von Influenza Viren von *Lipid Rafts*, wahrscheinlich über die Bindung und Hemmung von FPPS. Außerdem inhibiert es die Bildung von HCV Replikationskomplexen an Fettvakuolen durch Interaktion mit hVAP-33.

Für HCMV-Infektionen konnte gezeigt werden, dass die Synthese von frühen und späten viralen Proteinen, darunter pp65, gB und pp28, die für die Reifung und das Assembly notwendig sind, dramatisch reduziert war (83). Beim Influenza-A-Virus verhindert Viperin das Freisetzen neu produzierter Viruspartikel an der Oberfläche infizierter Zellen durch die Modulation von Lipidflößen (*lipid rafts*; vgl. Abb. 4). Vermittelt wird dies durch die Bindung und Hemmung von Viperin an die Farnesyldiphosphatsynthase (FPPS), ein Enzym, welches essentiell für die Biosynthese Isoprenoid-abgeleiteter Lipide, wie Cholesterin, ist (100, 95). Vielen Viren, inklusive dem Ebolavirus, HIV, dem Masernvirus und SENDV benutzen Lipidflöße in ihrem Vermehrungszyklus (101, 102, 103, 104). So ist es nicht verwunderlich, dass kürzlich die inhibierende Wirkung über die FPPS auch zur Hemmung der HIV-Replikation gezeigt werden konnte (97). Jedoch erklärt dieser Mechanismus nicht alle Wirkungen

von Viperin. So wirkt es auch inhibierend gegen HCV, ein Virus dessen Vermehrungszyklus nicht an *Lipid Rafts* gebunden ist (94).

Es ist bekannt, dass Fettvakuolen (*lipid droplets*) wichtig für die Replikation von HCV sind und sowohl Viperin, wie auch das nichtstrukturellen HCV-Protein (NS) 5A an diesen Organellen gebunden ist (105, 89, 106). Zum Aufbau des Replikationskomplexes benötigt HCV weiterhin das Wirtsprotein hVAP-33, was als Gerüstprotein zwischen NS5A und NS5B fungiert (107). Durch die Interaktion von Viperin mit hVAP-33 werden diese Wechselwirkungen unterbunden und der Aufbau des Replikationskomplexes gestört (108). Auch die Replikation von DENV und WNV ist an *Lipid Droplets* gebunden, was zu Spekulationen verleitet, dass dies ein allgemeiner Inhibitionsmechanismus für *Flaviviridae* sein könnte (109).

Viele Viren haben Mechanismen entwickelt, das IFN-System zu umgehen. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass Viperin indirekt über die Induktion von IFN, aber auch direkt in einer IFN-unabhängigen Weise in Virus-infizierten Zellen induziert werden kann (110). Mittlerweile sind mehrere Viren bekannt, die in der Lage sind, Viperin (auch) IFN-unabhängig zu induzieren – Japanische-Enzephalitis-Virus (JEV), HCMV, VSV und Chikungunyavirus (CHIKV) (vgl. Tabelle 2).

Der humane und murine Viperin-Promotor besitzen je zwei ISREs. Normalerweise verläuft die Signaltransduktion nach der Detektion von PAMPS durch PRRs wie unter 1.1.1 beschrieben, wobei unter anderem das mitochondrial lokalisiertes IPS-1 als Adapterprotein fungiert und es über die Expression von IFN zu einem fortwährenden antiviralen Effekt kommt. Jüngst wurde IPS-1 zusätzlich in den Membranen von Peroxisomen entdeckt. Dieses peroxisomale IPS-1 führt nach Virusinfektionen direkt zur Aktivierung von IRF1 und IRF3, was zur direkten Expression von Viperin und anderen ISGs und somit zu einem transienten, aber schnelleren antiviralen Effekt führt (vgl. Abb. 1; 111, 112, 113). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass VSV die Viperin-Expression direkt über IRF1 in einer STAT1-abhängigen Weise induzieren kann (vgl. Abb. 2). Dabei zeigte die Behandlung mit IFN-blockierenden Antikörpern keinen negativen Effekt auf die Induktion (98). Ein weiterer Mechanismus, der zur Induktion von Viperin führt, ist die Herunterregulation der endoribonuklearen RNase MRP. Patienten mit Knorpel-Haar-Hypoplasie, die eine geringe Enzymaktivität besitzen, zeigen höhere Expressionslevel von Viperin in ihren Leukozyten (114).

Es klingt paradox, dass so viele Viren die Expression eines Gens induzieren, das im Nachhinein ihre Vermehrung unterbindet. Es ist oft beschrieben, dass das angeborene und adaptive Immunsystem Viren, wie oben angesprochen, zur Entwicklung von Ausweichmechanismen treibt. So haben Viren auch Strategien entwickelt, der antiviralen Aktivität von Viperin zu entgehen.

Tabelle 2: Interferon-abhängige und unabhängige Induktion von Viperin durch Viren

Virusfamilie	Virus	IFN-abhängige Induktion	Referenzen
<i>Arenaviridae</i>	Lymphozytäre-Choriomeningitis-Virus	ja	115
<i>Flaviviridae</i>	Denguevirus (DENV)	Nicht getestet	116
	Gelbfiebertvirus	Nicht getestet	117
	Hepatitis-C-Virus (HCV)	Nicht getestet	94
	Japanische-Enzephalitis-Virus (JEV)	nein	118
	West-Nil-Virus (WNV)	Nicht getestet	99
<i>Herpesviridae</i>	Humanes Cytomegalovirus (HCMV)	nein	79, 83, 119
	Pseudorabies	ja	120
<i>Rhabdoviridae</i>	Vesikuläre-Stomatitis-Virus (VSV)	nein	120, 113, 98
<i>Paramyxoviridae</i>	Sendaivirus (SV)	ja	81
<i>Picornaviridae</i>	Rhinovirus	Nicht getestet	121
<i>Reoviridae</i>	Reovirus	nein	113
<i>Togaviridae</i>	Chikungunyavirus (CHIKV)	nein	122
	Sindbisvirus (SINV)	ja	91, 118

JEV induziert zwar die Expression von Viperin, leitet allerdings gleichzeitig, durch einen noch unbekannten Mechanismus, seine Degradation durch Proteasomen ein. So hat die Überexpression von Viperin keinerlei Effekt auf die Replikation des Virus. Der Proteasominhibitor MG132 jedoch erhöhte die Menge an exprimierten Viperin und enthüllte einen antiviralen Effekt (118). Des Weiteren induziert das CHIKV Viperin ebenfalls transkriptionell, allerdings blockiert es die Translationsmaschinerie der

Wirtszelle, was die Synthese des Proteins hemmt (122). Außerdem wurde kürzlich beschrieben, dass Viperin bivalent wirkt und die Replikation von HCMV begünstigt. HCMV induziert Viperin IFN-unabhängig und rekrutiert es vom ER zum Mitochondrium über Interaktion mit VMIA (*viral mitochondrial inhibitor of apoptosis*). Dort bindet es an HADHB und vermindert die zelluläre ATP-Produktion. Dies resultiert in der Modifizierung des Aktinzytoskeletts, was eine erhöhte Infektiosität von HCMV bedingt (123).

Des Weiteren wurde nachgewiesen, dass Viperin als Vermittler in der Signaltransduktion wirkt. Ein Vergleich von Viperin^{+/+} und Viperin^{-/-} pDCs lässt vermuten, dass Viperin die TLR7- und TLR9-induzierte Produktion an Typ I IFN in diesen Zellen steuert. Viperin rekrutiert IRAK1 und TRAF6 durch direkte Protein-Protein-Wechselwirkungen an Fettvakuolen in pDCs. Dies führt zur Ubiquitinierung von IRAK1, was die Kerntranslokation von IRF7 induziert und die Expression von Typ I IFN stimuliert (124).

1.2 Antivirale Mechanismen der adaptiven Immunität

Neben der Induktion von Typ I IFN führt die Erkennung von PAMPs durch PRRs auch zur Aktivierung von Zellen der angeborenen Immunität, welche spezifisch auf den Erreger reagiert. Nach einer Erkennung benötigen die beteiligten Lymphozyten jedoch einige Tage, um durch klonale Expansion zu proliferieren, damit eine effektive Eliminierung des Pathogens erfolgen kann. Das adaptive Immunsystem ist zusätzlich in der Lage, für bereits erkannte Antigene eine Art zelluläres Gedächtnis zu entwickeln und bei einem erneuten Kontakt mit demselben Erreger schnell eine effektive Sekundärantwort einzuleiten (7).

Die adaptive Immunität gliedert sich in die zelluläre Immunität, welche durch T-Zellen vermittelt wird, und in die humorale Abwehr, zu der die Aktivität von B-Zellen gehört.

B-Zellen oder B-Lymphozyten entwickeln sich im Knochenmark. Sie exprimieren membrangebundene Immunglobuline (Ig; Antikörper), die als B-Zell-Rezeptoren die Erkennung von Antigenen vermitteln. Ein Großteil der $1,5 \times 10^5$ Rezeptoren auf einer einzelnen B-Zelle hat die gleiche Spezifität. Nach Stimulation einer naiven reifen B-Zelle kommt es zu einer massiven Zellteilung und somit zur Expansion des B-Zellklons.

Die B-Zellen differenzieren zu Plasmazellen und zu Gedächtnis-B-Zellen. Plasmazellen haben eine geringere Dichte an B-Zell-Rezeptoren auf ihrer Oberfläche und sezernieren große Mengen an löslichen Antikörpern, deren Spezifität dem jeweiligen B-Zell-Rezeptor entspricht. Dabei unterscheidet man verschiedene Isotypen: IgA, IgD, IgE, IgM, sowie verschiedene Subklassen von IgG. Die pentameren IgM-Antikörper sind die ersten Immunglobuline, die nach einer Infektion sekretiert werden. Danach erfolgt ein Subklassenwechsel zu IgG, dem häufigsten Immunglobulin im Serum (7, 204).

T-Zellen entstehen aus pluripotenten somatischen Stammzellen im Knochenmark, durchlaufen aber die entscheidenden Reifungsschritte im Thymus, wo sie auf Reaktivität mit körpereigenen Antigenen getestet werden. Wie B-Zellen exprimieren T-Zellen auf ihrer Zelloberfläche Antigen-spezifische T-Zell-Rezeptoren. Diese sind allerdings nicht in der Lage, freie Antigene zu erkennen. Stattdessen erkennen T-Zell-Rezeptoren Antigenfragmente nur im Zusammenhang mit den Haupthistokompatibilitätskomplexen der Klasse I oder II (MHC I oder MHC II). MHC-Klasse-I-Moleküle werden auf nahezu allen kernhaltigen Zellen exprimiert, wohingegen MHC-Klasse-II-Proteine nur auf der Oberfläche von antigenpräsentierenden Zellen zu finden sind. T-Lymphozyten lassen sich in verschiedene Klassen unterteilen, darunter $CD4^+$ T-Helferzellen und zytotoxische, $CD8^+$ T-Zellen. Diese beiden T-Zellsubtypen unterscheiden sich dadurch, dass sie neben dem T-Zell-Rezeptor den $CD4$ - oder $CD8$ -Korezeptor exprimieren. $CD4^+$ T-Zellen sind MHC II restringiert. Nach ihrer Aktivierung beginnen sich die $CD4^+$ T-Zellen massiv zu teilen. T-Helferzellen sekretieren verschiedene Zytokine und spielen so eine regulatorische Rolle bei der Etablierung einer zellulären und humoralen Immunantwort sowie der immunologischen Gedächtnisinitiierung und -entwicklung. $CD8^+$ T-Zellen hingegen sind auf die Erkennung von MHC I beschränkt. Nach ihrer Aktivierung kommt es ebenfalls zur Expansion und zur Differenzierung zu zytotoxischen T-Zellen. Im Vergleich zu T-Helferzellen sezernieren sie jedoch nur geringere Mengen Zytokine und sind in der Lage, veränderte oder infizierte Zellen zu erkennen und anschließend zu eliminieren (7, 204). Bei vielen Virusinfektionen werden virusspezifische Antikörper gebildet, die die Virusverbreitung vermindern und eine Reinfektionen verhindern. Für die endgültige Eliminierung von Viren sind vor allem zelluläre Mechanismen wichtig: Infizierte Zellen werden durch zytotoxische T-Zellen oder durch NK-Zellen, die durch T-Helferzellen aktiviert wurden, eliminiert. Die hier beschriebenen Mechanismen gelten primär für

antivirale Aktivitäten in der Körperperipherie, während im zentralen Nervensystem (ZNS) andere, weniger gut verstandene Mechanismen eine Rolle zur Kontrolle von Virusinfektionen spielen (204).

1.3 Immunologische Vorgänge im zentralen Nervensystem

Dem ZNS, das aus Gehirn und Rückenmark besteht, kommt in der Immunologie eine privilegierte Rolle zu. Es wird durch spezielle Barrieren vom Blutsystem und damit vom Immunsystem des Körpers abgegrenzt. Die dominanteste dieser Barrieren wird als Blut-Hirn-Schranke bezeichnet und besteht aus einer Schicht über Tight Junctions eng miteinander verbundener Endothelzellen und einer Basalmembran, welche das Gehirn durchziehende kapillaren Blutgefäße auskleidet. Des Weiteren umgeben Mikroglia und Astrozyten diese Gefäße. Normalerweise ist diese Schranke für Proteine, Pathogene und andere lipophobe Stoffe undurchdringlich. Manche Viren können diese Barriere allerdings über neurogene Ausbreitung entlang der Nervenfasern, die Infektion der Endothelzellen oder über die Infektion von Immunzellen, welche die Blut-Hirn-Schranke ungehindert überqueren können, umgehen (140, 204).

Des Weiteren besteht das Gehirn aus Gliazellen und Neuronen. Letztgenannte sind sehr langlebige Zellen und häufig Ziel von Virusinfektionen. Aufgrund des limitierten Selbsterneuerungspotenzial wäre die zytolytische Eliminierung, wie sie in nicht-neuronalen Geweben oft vorkommt, mit großen Schädigungen des Gehirns verbunden, was alternative antivirale Mechanismen im Hirn unumgänglich macht (Review siehe 136).

Im gesunden, nicht-infizierten Hirn finden sich in der Regel keine immunologischen Aktivitäten. Die Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke exprimieren nur geringe Menge an Adhäsionsmolekülen (P-Selektine) auf der Oberfläche, was die Durchgängigkeit der Blut-Hirn-Schranke für Immunzellen erschwert. Die Neuronen produzieren lokal Neurotrophine und exprimieren das Oberflächenmolekül CD200. Die Interaktion des CD200-Liganden mit dem CD200-Rezeptors auf der Oberfläche von Mikroglia halten Mikroglia im inaktivierten Zustand (125). Astrozyten produzieren unter anderem das anti-inflammatorische Zytokin TGF- β , was die Aktivierung von Endothel- und anderen Zellen unterdrückt.

Klassische APCs sind normalerweise im ZNS nicht zu finden (126, 127). Stattdessen übernehmen die aus dem *Yolk Sack* stammenden Mikrogliazellen (Mikroglia) im ZNS die Aufgaben von Makrophagen (128). Wie konventionelle APC exprimieren sie TLR und MHC-Klasse-I und –MHC-II (129). Die Frage, ob es ZNS-endemische DCs gibt, wird derzeit kontrovers diskutiert. Es ist jedoch klar, dass myeloide DCs in den Meningen und der Zerebrospinalflüssigkeit vorkommen (130). Aktivierte T-Zellen sind in der Lage, das ZNS zu infiltrieren. Im nicht-entzündeten ZNS, wenn sie dort kein passendes Antigen vorfinden, verlassen sie das ZNS wieder oder sterben durch Apoptose (131). Für B-Zellen ist nicht abschließend geklärt, ob sie in das gesunde ZNS einwandern.

Sobald Viren Zellen des ZNS infizieren, kommt es zu einer schnellen Immunantwort. Die erste Abwehr bildet auch hier die Produktion von Typ I IFN. Wie bereits erwähnt fehlen hier pDCs, die in der Peripherie die Hauptproduzenten der IFN sind. Stattdessen wurde über *in situ* Hybridisierung gezeigt, dass nach Virusinfektion Typ I IFN hauptsächlich durch Parenchymzellen gebildet wird. Des Weiteren sind sowohl Gliazellen, wie Ependymzellen und Mikroglia, als auch Neurone in der Lage, Typ I IFN zu produzieren (132, 133). Dabei spielt $\text{INF}\beta$, was von Neuronen und Gliazellen produziert wird, eine große Rolle, da es weniger zytotoxisch auf Hirnzellen wirkt als $\text{INF}\alpha$. So führt die hirnspezifische Überexpression von $\text{INF}\alpha$ in Mäusen zu einer fortschreitenden Enzephalopathie mit zunehmenden Calciumeinlagerungen, Entzündungen, Gliose und verursacht letztendlich Neurodegeneration und den Tod (134). Alle Zellen des ZNS, inklusive der Neuronen, können auf Typ I IFN reagieren (132). Infizierte Neurone aktivieren umgebende Astrozyten und Mikroglia durch Sekretion diverser Zytokine und Chemokine, wie $\text{INF}\gamma$, IL6, CX3CL1 und CCL21 (135). Zusätzlich wird CD200 auf den Neuronen herunter reguliert, wodurch es zu einem Ende der CD200/CD200R-Interaktion kommt und die Mikroglia aktiviert werden.

Aktivierte Astrozyten und Mikroglia schütten daraufhin weiter proinflammatorische Zytokine und Chemokine (IL1, IL6, IL12, TNF, CCL2, CCL4, CCL5, CCL7, CXCL10) aus. Dies resultiert in einer gesteigerten Expression von MHC-Klasse-I- und –II auf der Oberfläche von Mikroglia und einer verstärkten Expression von Adhäsionsmolekülen auf der Oberfläche von Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke (ICAM1/VCAM1), was eine verstärkte Infiltration von Zellen der adaptiven Immunabwehr in das ZNS

ermöglicht (136). Es ist allgemein anerkannt, dass die Aktivierung von naiven T- und B-Zellen nicht im ZNS stattfindet, sondern hauptsächlich in sekundären lymphatischen Organen erfolgt. Diese aktivierten T-Zellen ($CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen) wandern nun verstärkt ins ZNS ein und treffen dort auf das für ihren TCR spezifische Antigen. Neben aktivierten T-Zellen findet man bei inflammatorischen Vorgängen auch alle anderen Komponenten der zellulären Immunabwehr im ZNS (NK-Zellen, B-Zellen und Monozyten/Makrophagen). Wie in der Peripherie ist die Eliminierung der Viren im ZNS ein mehrstufiger Prozess: Er beinhaltet die Inhibition der Virusausbreitung von Zelle zu Zelle, die Entfernung freier Viren im Blut und im Interzellularraum sowie die Eliminierung virusinfizierter Zellen bzw. die dauerhafte Unterdrückung der Virusreplikation. Wie bereits erwähnt, ist es von Vorteil, wenn antivirale Aktivitäten innerhalb des ZNS nicht zur Zerstörung von Neuronen führen. Bei Infektionen mit verschiedenen RNA-kodierten Viren, wie Rabiesvirus, Theilers-Murines-Enzephalomyelitis-Virus und Maus-Hepatitisvirus, ist bekannt, dass antivirale Aktivitäten hauptsächlich von Antikörpern vermittelt werden. Virus-neutralisierende Antikörper sind meist direkt gegen virale Oberflächenproteine gerichtet und inhibieren die Virusreplikation (137). Oft ist die Viruselimination unvollständig und virale RNA kann lebenslang nachgewiesen werden. Daher ist eine ständige Kontrolle der Viren durch das Immunsystem notwendig (138, 139). In den meisten Fällen richten sich die Aktivitäten zytotoxischer T-Zellen nicht gegen infizierte Neurone. Dem gegenüber sind für die Eliminierung von virusinfizierten Gliazellen zytotoxische T-Zell-vermittelte Aktivitäten ein geeignetes Mittel, da Gliazellen leicht zu regenerieren sind und der Verlust der Zellen keine schwerwiegenden Folgen hat (136).

1.4 Das Vesikuläre-Stomatitis-Virus

Viele Viren zeigen einen Neurotropismus, d.h. sie sind in der Lage, bevorzugt neuronale Gewebe zu infizieren. Dies kann bei vielen Vertretern, wie dem Masernvirus, Poliovirus oder Rabies-Virus beim Menschen, zu schweren Krankheitsbildern bis hin zum Tod führen. Das Rabies-Virus ist ein Virus aus der Familie der *Rhabdoviridae*. Diese umfasst die zwei Gattungen der *Vesiculoviridae* sowie die der *Lyssaviridae*. Als ein bedeutsamer Vertreter der *Vesiculoviridae* ist das Vesikuläre-Stomatitis-Virus (VSV) zu nennen (140). Die Transmission von VSV auf den Menschen ist lediglich

durch Laborkontamination bei Experimentatoren dokumentiert und führte nur zu grippeähnlichen Symptomen (141). Außerdem ist es hinsichtlich seiner Molekularbiologie und seinem Replikations-Mechanismus gut verstanden und man kann es einfach in Zellkultursystemen vermehren. Deshalb wird es seit Jahrzehnten als Modell für neurotrope Viren in Mäusen verwendet (142).

VSV ist ein Virus mit einem 11,162 kb großen einzelsträngigem, nicht-segmentierten RNA-Genom in Negativorientierung. Seine infektiösen Partikel sind stäbchenförmig, geschossähnlich und haben eine Länge von etwa 180 nm bei einem Durchmesser von 65 nm (vgl. Abb. 5). Sie bestehen aus zwei Komponenten: einem Nucleocapsid und einer Membranhülle. Das Nucleocapsid ist in 35 enge helikale Windungen gefaltet und besteht aus den viralen Proteinen N, P und L, sowie dem RNA-Genom (140). Das L-Protein ist die RNA-abhängige RNA-Polymerase, die bei den Negativviren ein Bestandteil des Virions ist. In die Membranhülle sind Trimere aus dem Glycoproteine G eingelagert, welche für die Bindung des Virus an einen Zelloberflächenrezeptor und die Fusion des Virus mit der endosomalen Membran verantwortlich sind (143). Es ist auch das Hauptantigen, gegen das antivirale Antikörperantworten gerichtet sind. Mit der Innenseite der Membran ist das Matrixprotein M assoziiert, das gleichzeitig auch mit den Nucleocapsidkomponenten wechselwirkt und dessen enge Packung im Partikelinneren gewährleistet (140).

Wie alle tierischen *Rhabdoviridea* besitzt VSV ein sehr weites Wirtsspektrum und kann so unterschiedlichste Organismen infizieren. Es vermehrt sich in Insekten, einschließlich Stechmücken und Fliegen, aber auch Säugetieren und verursacht bei Pferden, Rindern und Schweinen schwere Tierseuchen (Bläschenkrankheit). Die Übertragung erfolgt normalerweise durch Insektenstiche oder durch Bisse infizierter Tiere (155).

VSV wird im Mausmodell als Prototyp für neurotrope Viren angesehen. Die experimentelle Gabe von VSV kann für Mäuse tödlich verlaufen, wobei das Ausmaß der Krankheit von der Dosis, dem Infektionsweg und dem verwendeten Serotyp abhängt. Anders als eine intranasale (i.n.) Infektion können Mäuse eine intravenöse (i.v.) oder intraperitoanale (i.p.) Infektion bis zu einer Dosis von 10^8 pfu überstehen. Nach i.n. Inokulationen gelangt das Virus innerhalb von 12-24 h über die Infektion der olfaktorischen Rezeptorneuronen (ORN) der Nase in das ZNS. VSV repliziert invasiv im *Bulbus olfactorius* und erzeugt fokale zytopathische Effekte. Abhängig vom

Virusstamm und der Infektionsdosis kommt es zu Entzündungsreaktionen und Nekrosen um die Infektionsherde und zur Ausbreitung bis hin zur *Medulla oblongata* (144, 145).

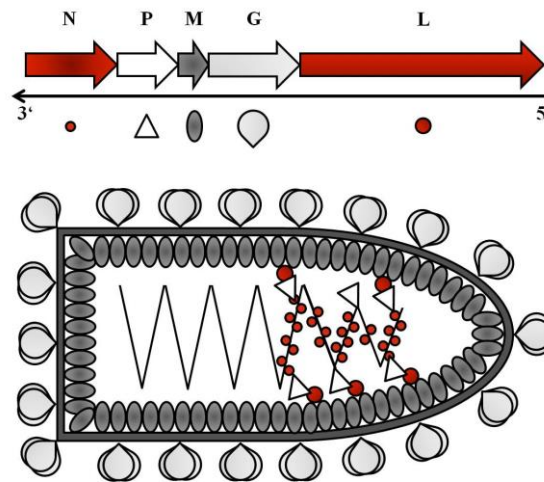


Abb. 5: Aufbau des VSV-Partikels (adaptiert 140)

Das Genom besteht aus einer einzelsträngigen RNA, die mit den N, P- und L-Proteinen zu einem helikalen Nucleocapsid interagieren. Das Nucleocapsid ist von einer Membranhülle umgeben, in welche die G-Proteine eingelagert sind. An die Innenseite der Membran bindet das M-Protein, das gleichzeitig mit den Nucleocapsidkomponenten wechselwirkt.

Die Immunantwort gegen VSV wurde intensiv untersucht. Auch bei dieser viralen Infektion stellen IFN einen wichtigen Teil der initialen Abwehr dar. Selbst 4 Tage nach der i.n. Infektion erhöht die Behandlung mit IFN die Überlebenswahrscheinlichkeit der Mäuse (146). Tiere, denen der IFNAR fehlt, sind deutlich anfälliger gegenüber VSV-Infektionen als Wildtyp-Mäuse. Interessanterweise überleben IFN Type II Rezeptor-defiziente Mäuse wesentlich länger, was auf eine geringere Bedeutung von IFN γ schließen lässt (33). In Zellkulturexperimenten konnte für mehrere ISGs, darunter Mx2, Rsad2 und Usp18, ein direkter Einfluss auf die Hemmung der Replikation von VSV nachgewiesen werden (147, 98). ISG20 inhibiert spezifisch die VSV-mRNA- und -Proteinsynthese während es die Expression zellulärer Kontrollgene unbeeinflusst lässt (148). Des Weiteren konnte *in vivo* gezeigt werden, dass Ifit2 überlebenswichtig bei i.n. VSV Infektionen ist (77). Der genaue Mechanismus ist jedoch ungeklärt.

Wie viele Viren hat VSV Strategien entwickelt, um dem IFN-System zu entgehen. Das Matrix-Protein von VSV interagiert mit dem Transkriptionskomplex am IFN β -Promotor, was zu einer transkriptionalen Hemmung des Gens führt. Des Weiteren wird durch die Interaktion des M-Proteins mit dem Rae1/Nup98 (*nucleoporins mRNA export factor 1/Nucleopore of 98 kDa*) Komplex der nukleare Transport der IFN-mRNA

beeinträchtigt (149, 150). Neben IFN inhibiert Stickstoffmonoxid (NO) die VSV-Replikation (151). Die Infektion mit VSV führt zur Induktion der Expression der NO-Synthetase in den Neuronen des *Bulbus olfactorius*. Die Hemmung des Enzyms erhöht den Virustiter im Gehirn um das 10-fache (152). Eine weitere kritische Komponente des Immunsystems in der Bekämpfung von VSV sind Antikörper. B-Zell-defiziente Mäuse sind susceptibler, wenn der passive Schutz von Antikörpern fehlt (153). VSV induziert eine robuste Antikörper-Antwort. Acht Tage nach der Infektion sind 50 % der detektierten IgG2a spezifisch für VSV. Im Gegensatz dazu scheint die T-Zell-Antwort eine untergeordnete Rolle bei der Bekämpfung einer VSV-Infektion zu spielen. Mäuse entwickeln zwar VSV-spezifische T-Zellen, Mäuse mit intakter T-Zell-Antwort, denen B-Zellen fehlen, zeigen jedoch eine erhöhte Sterblichkeit (153). Für den subkutanen und i.v. Infektionsweg konnte nun gezeigt werden, dass nicht die durch B-Zellen produzierten Antikörper, sondern die B-Zellen selbst wichtig für die Bekämpfung des Virus sind. So produzieren B-Zellen Lymphotoxin $\alpha 1\beta 2$ (TNF β), was für die Aufrechterhaltung eines bestimmten Phänotyps in CD196⁺ Makrophagen im Sinus der assoziierten Lymphknoten essentiell ist (154). Dies ermöglicht die Replikation des Virus in diesen Makrophagen, was zur Sekretion von IFN führt. Dies stimuliert die Immunantwort und ermöglicht die Vernichtung des Virus vor dem Eintritt in das ZNS (155).

2 Zielsetzung der Arbeit

IFN sind Zytokine, die nach Erkennung von Pathogenstrukturen von Zellen produziert werden. Das sekretierte IFN führt in infizierten und nicht-infizierten Zellen zur Induktion von ISGs. Einige ISGs besitzen antivirale Wirkung, welche die Ausbreitung von Viren verhindern und Zellen des angeborenen und erworbenen Immunsystems stimulieren, um das Pathogen vollständig zu eliminieren. Viele Viren haben Strategien entwickelt, die Induktion oder die Wirkung des IFN-System zu blockieren (50). Die Familie der IRFs sind Transkriptionsfaktor, welche an der Induktion von IFNs beteiligt sind. Für IRF1 und IRF3 konnte zusätzlich gezeigt werden, dass sie alternative Abwehrmechanismen auslösen können und ISGs auch IFN-unabhängig induzieren können (98).

Viperin ist ein sehr potentes antivirales ISG, das die Vermehrung vieler verschiedener Viren hemmt. Es kann sowohl IFN-abhängig, wie auch IFN-unabhängig induziert werden. Obwohl das Wissen über die Wirkung von Viperin in den letzten Jahren dramatisch anstieg, ist weitgehend unklar, welche Rolle dieser integrierte Schutzmechanismus für die Immunabwehr spielt. Weiterhin ist über die zeitliche und räumliche Expression von Viperin im Organismus nach Virusinfektionen wenig bekannt. Deshalb soll eine Rsad2-Reportermaus hergestellt werden, in der das Viperin-Gen durch ein Reportergen ersetzt wird. Dies ermöglicht die Untersuchung, wann und in welchen Organen bzw. Zellen das Gen nach viralen Infektionen induziert wird bzw. welche Funktion das Gen bei der antiviralen Abwehr *in vivo* spielt.

IRF5 ist ein Transkriptionsfaktor, welcher an der Regulation proinflammatorischer Zytokinen beteiligt ist. Die Assoziation von IRF5 mit diversen Autoimmunerkrankungen ist gut dokumentiert (64, 65, 66, 67 , 68, 69, 70). In der Literatur findet man widersprüchliche Daten über die Rolle von IRF5 bei Induktion von Typ I IFN und dessen antivirale Wirkung (1, 2, 3, 4, 5). Daher soll die Rolle von IRF5 an der antiviralen Wirtsabwehr untersucht werden.

3 Ergebnisse

3.1 Generierung einer Rsad2-Reportermaus

Die Induktion des IFN-Systems ist eine der ersten Immunantworten nach einer viralen Infektion. Die Aktivität von Typ I IFNs werden durch ISGs vermittelt. Viperin ist ein evolutionär hoch konserviertes, phylogenetisch weit verbreitetes ISG. Es inhibiert die Vermehrung vieler verschiedener Viren.

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es, eine Knock-in-Rsad2-Reportermaus zu etablieren. Dazu sollte ein Reportergen gezielt in das Genom integriert werden, so dass es direkt unter der Kontrolle des Rsad2-Promotors anstelle des Viperins exprimiert wird. Mit dieser Mauslinie sollte es möglich sein, sowohl die antivirale Funktion Viperins nach Virusinfektionen wie auch seine zeitliche und räumliche Regulation zu untersuchen.

3.1.1 Generierung des Reporterkonstruktes zur homologen Rekombination in embryonalen Stammzellen

Ein großer Fortschritt bei der Generierung von transgenen Mäusen wurde durch bakterielle artifizielle Chromosomen (BACs) erzielt (156). BACs stellen künstliche Chromosome dar, die auf dem Fertilitäts-Faktor (auch F-Plasmid) von *E. coli* basieren und Genomfragmente von bis zu 300 kBp enthalten (157). In dieser Arbeit wurde ein kommerziell verfügbares BAC (BAC-Klon RP24-300C13, BACPAC Resources) verwendet, das einen Genabschnitt von Chromosom 12 enthält, der das Rsad2-Gen beinhaltet.

Die Strategie zur Herstellung der Reportermaus ist in Abb. 6 dargestellt. Sie sieht vor, die kodierende Sequenz des Viperins auf dem BAC mittels Recombineering mit einer Reporter-Resistenzkassette auszutauschen. Nach korrekter Insertion über homologe Rekombination liegt die Expression des Reporters unter der Kontrolle des Rsad2-Promotors. Die Rekombinationskassette besteht aus der kodierenden Sequenz des rot fluoreszierenden Proteins Turbo FP635 und dem von FRT-Sequenzen (*Flp-recombinase*

targets) flankierten Neomycin-Phosphotransferase-Gen (*nptII*). Diese Erkennungsstellen erlauben ein nachträgliches Entfernen der Selektionskassette durch die Flp-Rekombinase. Das Antibiotikumresistenzgen zur positiven Selektion in pro- und eukaryotischen Zellen steht unter der Kontrolle eines Phosphoglycerat-Kinase- (PGK) Promotors.

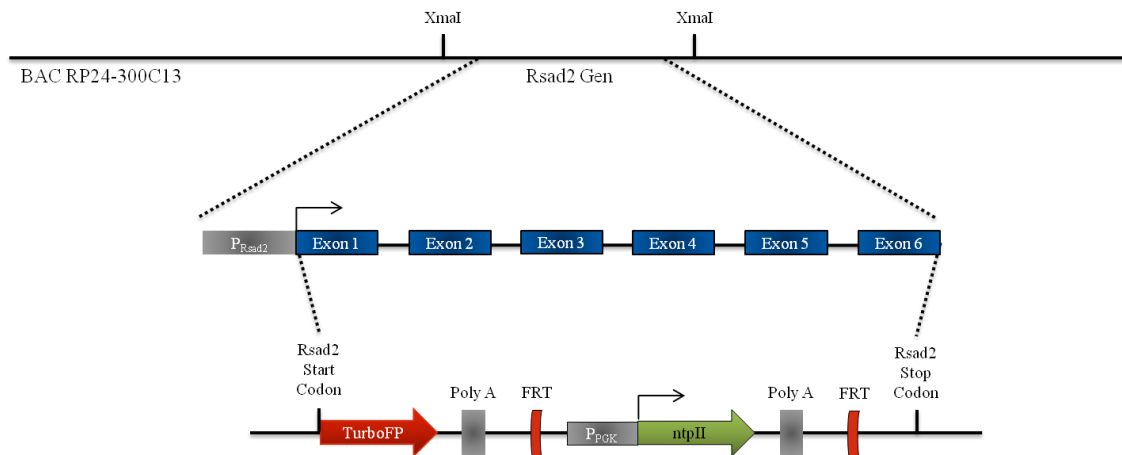


Abb. 6: Schematische Darstellung der BAC-Recombineering-Strategie

Dargestellt ist der BAC RP24-300C13, der zwischen den XmaI-Restriktionsstellen das Viperin-Gen mit 6 Exons enthält. Die Rekombinationskassette besteht aus dem Reportergen TurboFP635, gefolgt von einem SV40 Poly A-Signal. Es folgt eine durch FRT-Sequenzen flankierte Selektionskassette, die aus dem Phosphoglycerat-Kinase-Promotor (P_{PGK}) getriebenen Neomycin-Phosphotransferase-Gen (*nptII*) und einem BGH Poly A-Signal, besteht. Der offene Leserahmen von Rsad2 auf dem BAC wurde mit Hilfe des Red-Rekombinase-Systems mit der Rekombinationskassette ausgetauscht.

Diese Reporterkassette wurde mittels PCR unter der Verwendung der Primer Bacfor und Bacrev amplifiziert. Die Oligonukleotide beinhalten 50 Bp, die homolog zum 5'- bzw. 3'-UTR vor dem Start- respektive nach dem Stop-Codon des Rsad2-Gens sind. Mit Hilfe des Red-Rekombinase-System des Phagen λ wurde dieses PCR-Fragment gegen die kodierende Sequenz des Rsad2-Gens im BAC ausgetauscht (158).

Viperin ist ein durch Typ I IFN hoch induzierbares ISG. Um zu untersuchen, ob die Expression des Reportergens durch den IFN-induzierbaren Rsad2-Promotor im hergestellten BAC reguliert wird, wurde die BAC-DNA isoliert und mittels Lipofecten 2000 transient in NIH3T3 Zellen transfiziert. Die Zellen wurden 24 h mit 500 U/ml IFN β inkubiert und die Expression des TurboFP635 mittels Durchflusszytometrie überprüft.

Nicht-induzierte Zellen zeigten keine Expression des TurboFP635 (vgl. Abb. 7A). Im Gegensatz dazu, war nach der Stimulation mit IFN β in einem Großteil der Zellpopulation die Expression des Reporters nachweisbar (vgl. Abb. 7B).

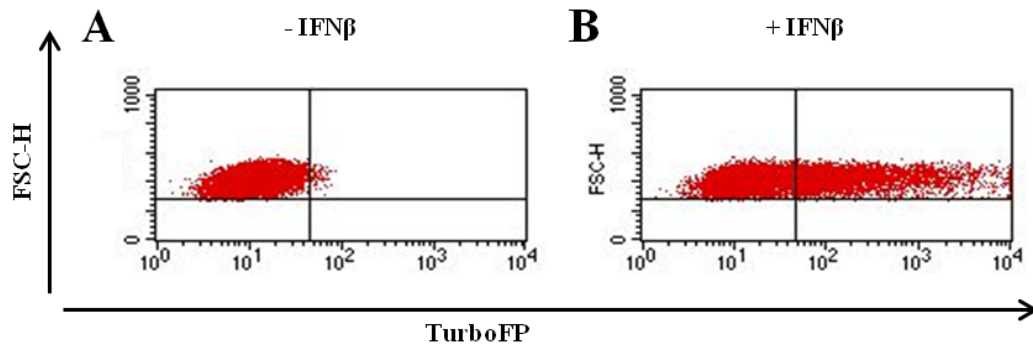


Abb. 7: Der BAC-Reporter ist durch Typ I IFN induzierbar

NIH3T3 Zellen wurden mit dem Reporter-BAC transient transfiziert. Die Zellen blieben unbehandelt (A) oder wurden für 24 h mit 500 U/ml IFN β stimuliert (B). Die Expression des TurboFP635 wurde mittels Durchflusssytemetrie überprüft.

Dieses Ergebnis zeigt, dass das BAC-Konstrukt funktional ist und die Expression des TurboFP635 über den IFN-induzierbaren Promotor des Rsad2 kontrolliert wird.

3.1.2 Generierung genetisch veränderter embryonaler Stammzellen durch homologen Rekombination

Zur Herstellung von Knock-in-Mäusen sollte die hergestellte Reporter-kassette über homologe Rekombination gerichtet in embryonale Stammzellen der Maus (mES) eingebracht werden.

BACs können in verschiedenen Formen in Zielzellen transferiert werden: als zirkuläres supercoiled Plasmid, linearisierte DNA oder gereinigtes DNA-Fragment. Um die Gefahr von DNA-Brüchen und damit die Integration unerwünschter DNA Fragmente ins Genom zu vermindern, wurde in dieser Arbeit der Eintrag linearisierter DNA bevorzugt (159). Dazu wurde das BAC-Konstrukt mit XmaI so geschnitten, dass jeweils 5' und 3' ca. 2000 Bp lange Homologieabschnitte für die homologe Rekombination zur Verfügung standen (vgl. Abb. 6). Die DNA wurde mittels Lipofecten 2000 in mES der Zelllinie IB10 transfiziert. Neomycin-resistente Klone

wurden mittels Southern Blot-Analyse darauf hin überprüft, wie viele Kopien ins Genom integriert waren und ob die Integration in den gewünschten Rsad2-Genloкус erfolgt war. Dabei wurde das Restriktionsenzym so gewählt, dass es innerhalb und außerhalb des inserierten Reporterfragmentes schnitt (vgl. Abb. 8A).

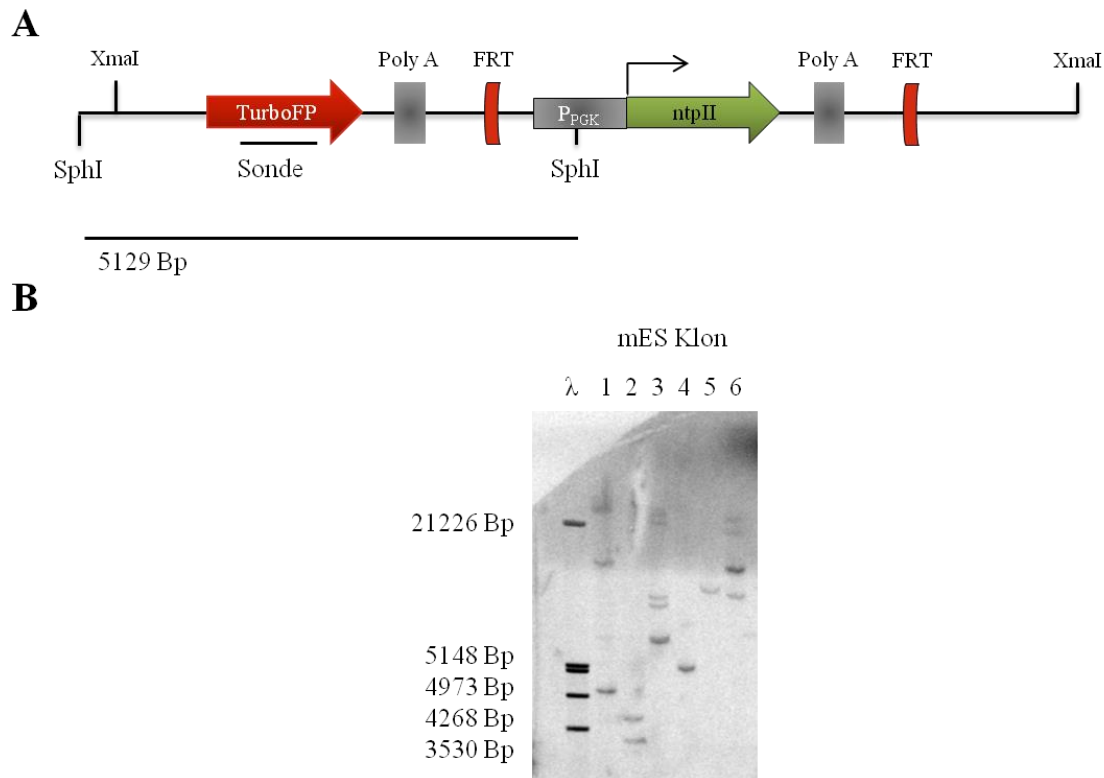


Abb. 8: Charakterisierung der mES-Zellklone nach homologer Rekombination

A, Schematische Darstellung der genomischen DNA nach Integration der Rekombinationskassette durch homologe Rekombination. B, Southern Blot Analyse der genomischen DNA aus 6 mES-Zellklonen. Die DNA wurde mit dem Restriktionsenzym SphI verdaut. Die Hybridisierung mit der spezifischen Sonde sollte, nach homologer Rekombination eine Bande von 5,2 kBp ergeben. λ = Längenstandards (Lambda DNA/EcoRI und HindIII)

Insgesamt wurden 36 G418-resistente Klone analysiert. Bei dem richtigen Rekombinationsereignis wurde eine Bande bei 5,2 kBp erwartet. Wie in Abb. 8 zu sehen, zeigte der Zellklon Nr. 4 eine Bande der richtigen Größe.

Es konnte ein mES-Klon identifiziert werden, der eine Kopie der Reporter-kassette in den Rsad2-Genloкус integriert hatte. Dieser Zellklon sollte zur Generierung der transgenen Mäuse verwendet werden.

3.1.3 Generierung chimärer Mäuse

Zur Herstellung transgener Mäuse wurde der IB10 mES Zellklon mit der korrekt über homologe Rekombination integrierten Kasette in C57Bl/6N Blastozysten injiziert. Die Blastozysteninjektion wurde in der tierexperimentellen Einheit des Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung in Braunschweig durchgeführt. Die mikroinjizierten Blastula wurden in scheinsschwangere Ammen transferiert, in denen sich chimäre Nachkommen entwickelten, die sowohl Erbinformationen der mutierten Stammzelle als auch der Blastozyste enthielten (vgl. Abb. 9).

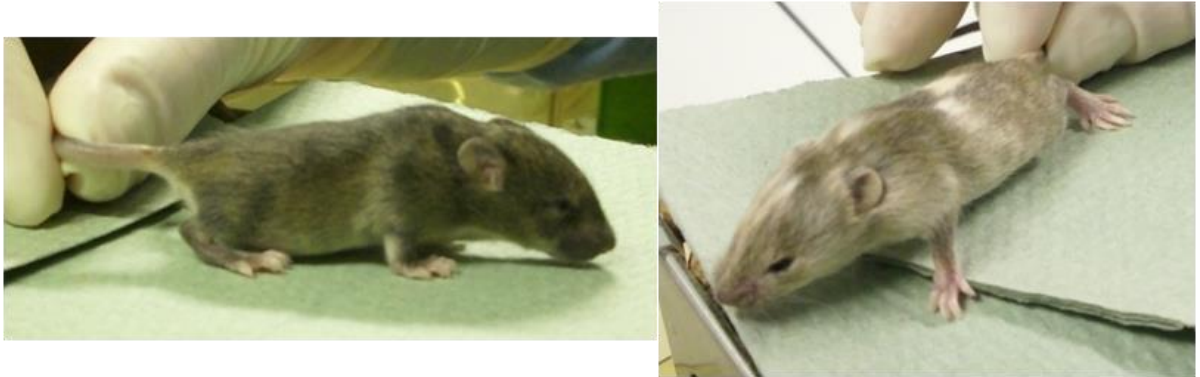


Abb. 9: Chimäre Mäuse

Erkennbar ist die gefleckte Fellfarbe aus helleren (Mausstamm 129/Ola) und aus dunkleren (Mausstamm C57Bl/6) Regionen.

IB10 mES Zellen wurden ursprünglich aus der Blastozyste eines männlichen Embryos des Mausstammes 129/Ola isoliert (160). Dieser Stamm zeichnet sich durch die Fellfarbe Agouti aus. Da der Klon in C57Bl/6 Blastozysten (schwarze Fellfarbe) injiziert wurde, können entstandene Chimäre an ihrer Fellfärbung identifiziert werden.

Aus 3 Injektionen wurden 8 Chimäre mit einem Chimärismus zwischen 10 % und 100 % geboren (vgl. Tabelle 3). Aufgrund der Verwendung einer männlichen Stammzell-Linie war zu erwarten, dass zum einen mehrheitlich männliche Chimäre geboren werden und zum anderen wegen der notwendigen Keimbahntransmission ausschließlich männliche Chimären in der Lage sein würden, ihre genetische Manipulation an folgende Generationen weiterzugeben. Es wurden ein Weibchen und 7 Männchen geboren, die mit C57Bl/6 Mäusen gekreuzt wurden.

Tabelle 3: Übersicht über die Eigenschaften der durch Blastozysteninjektion generierten Chimäre

Chimärismus	Geschlecht	Keimbahngängigkeit
agouti 50 %, beige 48 %, weiß 2 %	Männlich	Ja
chimär 85 %, weiß 15 %	Männlich	Ja
agouti 50 %, beige 50 %	Männlich	Ja
agouti 85 %, schwarz 15 %	Männlich	Ja
chimär 100 %	Männlich	Ja
chimär 80 %	Männlich	Nein
schwarz 90 %, agouti 10 %	Männlich	Nein
schwarz 70 %, beige 20 %, weiß 10 %	Weiblich	Nein

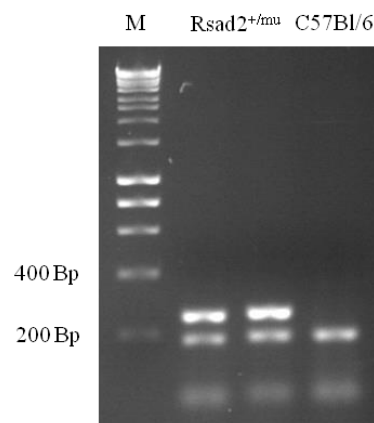
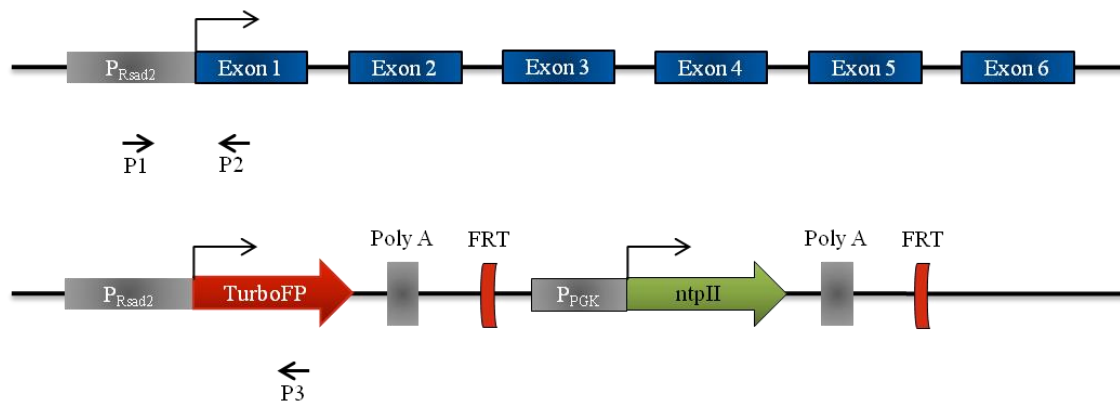


Abb. 10: Genotypisierung der F1-/F2-Generation

Die Primerkombination Rsad2KO P1/P2/P3 erlaubt die Unterscheidung zwischen den verschiedenen Genotypen. Auf dem Wildtyp-Allel wird durch die Primer P1 und P2 ein 173 Bp Fragment amplifiziert. Das Primerpaar P1/P3 führt unter den gewählten Reaktionsbedingungen beim Knock-in zur Amplifikation eines 238 Bp Fragments, das Wildtyp-Fragment kann nicht entstehen. Bei heterozygoten Tieren werden beide Fragmente amplifiziert.

5 von 8 Verpaarungen zeigten eine erfolgreiche Keimbahntransmission, was durch PCR auf das Reportergen verifiziert wurde (vgl. Abb. 10). Diese heterozygoten $Rsad2^{+/mu}$ der F1-Generation wurden zur Züchtung homozygoter $Rsad2^{mu/mu}$ Mäuse weiterverpaart. Dabei war zu erwarten, dass die Nachkommen mit einer Wahrscheinlichkeit von 25 % transgen sind. Nach der Untersuchung von 60 Tieren konnten keine homozygoten $Rsad2^{mu/mu}$ Mäuse mit einer Deletion des *Rsad2* Gens generiert werden.

Um zu validieren, ob die generierten transgenen Tiere die korrekte Insertion der Reporterkassette in den *Rsad2*-Lokus enthielten, wurde die Insertion über eine Southern Blot Analyse überprüft. Dazu wurde die genomische DNA aus den Splenozyten der Mäuse aus der F2 Generation isoliert. Es konnten keine Nachkommen mit korrekter Insertion bestimmt werden (vgl. Abb. 11).

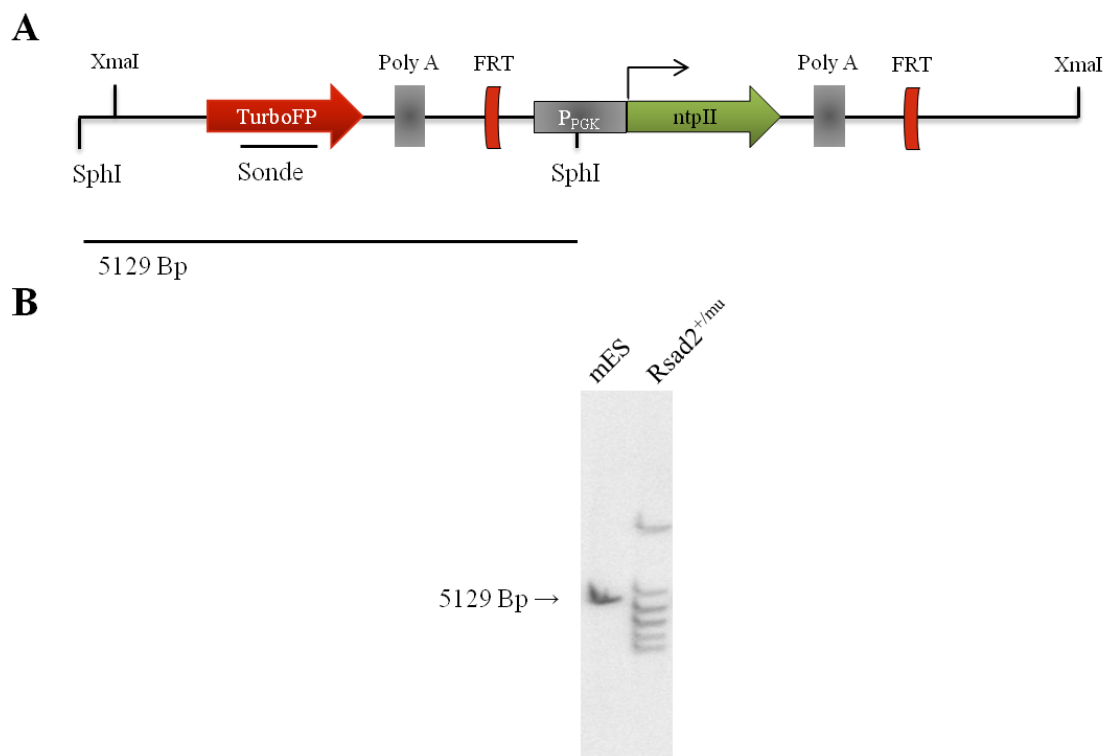


Abb. 11: Charakterisierung der transgenen Mäuse der F2 Generation

A, Schematische Darstellung der genomischen DNA nach Integration der Rekombinationskassette durch homologe Rekombination. B, Southern Blot Analyse der genomischen DNA aus dem in die Blastozysten injizierten mES-Zellklon (mES) und aus den Splenozyten einer Maus der F1-Generation ($Rsad2^{+/mu}$). Die DNA wurde mit dem Restriktionsenzymen SphI verdaut. Die Hybridisierung mit der spezifischen Sonde sollte, nach homologer Rekombination eine Bande von 5,2 kBp ergeben.

3.2 Charakterisierung der antiviralen Aktivität von IRF5

IRF5 ist ein wichtiger Transkriptionsfaktor bei der Induktion von Typ I IFNs und proinflammatorischen Zytokinen. Seine Bedeutung bei der Entwicklung von Autoimmunerkrankungen ist gut charakterisiert. *In vitro* wurde gezeigt, dass IRF5 an der antiviralen Wirtsantwort beteiligt ist. Die genauere Charakterisierung *in vivo* wurde jedoch nicht erforscht. Der zweite Teil dieser Dissertation widmet sich der Aufgabe, die Rolle von IRF5 in der angeborenen und erworbenen Immunität näher zu untersuchen.

3.2.1 IRF5^{-/-} Mäuse sind suszeptibel gegenüber viralen Infektionen

Der Transkriptionsfaktor IRF5 ist an der Induktion von Typ I IFN und inflammatorischen Zytokinen beteiligt. *In vitro*-Studien weisen darauf hin, dass IRF5 antivirale Aktivität vermittelt (2). Um den Einfluss von IRF5 bei viralen Infektionen *in vivo* zu testen, wurde die Suszeptibilität von C57Bl/6 und IRF5^{-/-} Mäusen auf Infektionen mit dem -ss RNA-Virus VSV untersucht.

Mäuse wurden mit 1×10^4 pfu VSV i.n. inokuliert. Diese Infektionsroute stellt für Mäuse einen natürlichen Infektionsweg dar (161). Tiere, die nicht auf Typ I IFN reagieren können, weil ihnen der Rezeptor fehlt (IFNAR^{-/-}), zeigen eine hohe Sensitivität gegenüber i.n. Infektionen mit VSV (31). Daher dienten IFNAR-defiziente Mäuse als positive Kontrolle und wurden mit 1×10^2 pfu infiziert. Das Überleben der Mäuse wurde über 14 Tage beobachtet und der Gesundheitszustand der Mäuse, anhand der in 5.2.2 geschilderten Kriterien, täglich geprüft (vgl. Abb. 12).

Die infizierten Wildtyp-Mäuse tolerierten die Infektion ohne erkennbare Anzeichen einer Erkrankung. Selbst eine Infektion mit einer sehr hohen Dosis von 1×10^7 pfu überlebten die Tiere ohne phänotypische Auffälligkeiten (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu starben die IFNAR^{-/-} Mäuse innerhalb von fünf Tagen nach der Infektion. Dabei verloren sie schnell an Gewicht und zeigten am Tag vor ihrem Tod deutliche Krankheitsanzeichen wie Lethargie und struppiges Fell.

IRF5^{-/-} Mäuse zeigten eine Anfälligkeit gegenüber VSV. Allerdings blieben diese Tiere zunächst symptomfrei. Ab dem 5. Tag nach der Infektion verloren sie an Gewicht,

bekamen struppiges Fell, zeigten Apathie, Anzeichen von Schmerz und teilweise Lähmungen der Hinterläufe und starben 10 Tagen nach der Infektion.

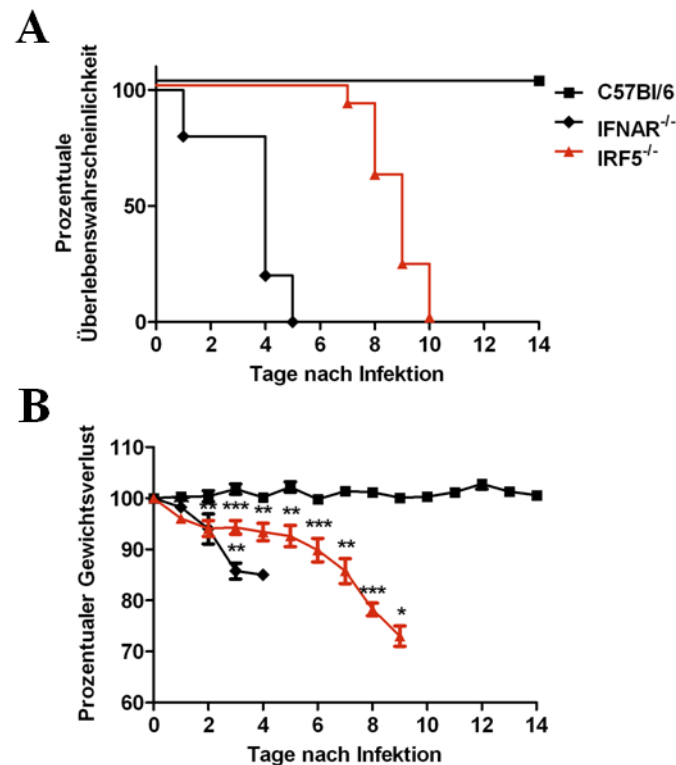


Abb. 12: IRF5 schützt Mäuse vor einer tödlich verlaufenden intranasalen VSV-Infektion

C57Bl/6 (n = 10) und IRF5^{-/-} (n = 13) Mäusen wurden mit 1×10^4 pfu VSV, IFNAR^{-/-} (n = 5) Mäusen mit 1×10^2 pfu VSV i.n. infiziert. A, Untersuchung der Überlebenswahrscheinlichkeit mittels Kaplan-Meier Analyse. Unterschiede der Überlebenswahrscheinlichkeit sind signifikant ($p < 0,0001$). B, Prozentuale Änderungen des mittleren Körpergewichts im Verlauf der Infektion. Das Körpergewicht wurde am Tag 0 (Tag der Infektion) rechnerisch auf 100 % gesetzt. * $p \leq 0,0183$, ** $p \leq 0,005767$, *** $p \leq 0,0008471$

Die Ergebnisse zeigen, dass IRF5 essentiell für das Überleben der Tiere nach i.n. VSV-Infektion ist. Die klinischen Symptome der IRF5^{-/-} Mäuse weisen auf neurologische Schädigungen hin, wohingegen die Krankheitszeichen der IFNAR^{-/-} Mäuse eher auf eine systemische Erkrankung wie Lungen- oder Multiorganversagen, schließen lässt.

Um zu überprüfen, ob IRF5 virusspezifische Funktionen besitzt, wurde die Suszeptibilität von C57Bl/6 und IRF5^{-/-} Mäusen gegenüber dem Langat-Virus (LGTV) getestet.

LGTV ist ein natürlich attenuiertes Flavivirus aus dem TBEV-Komplex, dem Erreger der Frühsommer-Meningoenzephalitis. Das Genom des Virus besteht aus einer unsegmentierten ssRNA positiver Polarität mit einer Länge von ca. 11 kbp (140). Die

Mäuse wurden mit 1×10^4 pfu LGTV intraperitoneal (i.p.) infiziert und ihr Überleben 21 Tage lang beobachtet (vgl. Abb. 13).

Wildtyp-Mäuse überlebten die Infektion mit LGTV symptomfrei. Die IRF5-defizienten Tiere zeigten einen ähnlichen Krankheitsverlauf wie bei der vorangegangenen Untersuchung. Sie blieben zunächst klinisch unauffällig. Ab dem 8. Tag zeigten sie eine Abnahme der Aktivität, sie verloren an Gewicht, hatten verklebte Augen und zeigten mehrheitlich eine Lähmung der Hinterläufe und starben zwischen Tag 10 und 13 nach der Infektion.

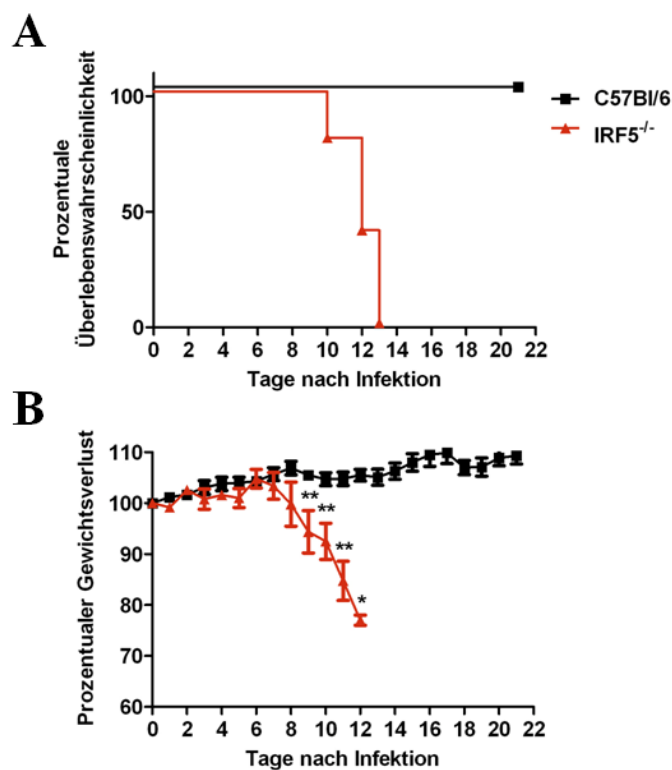


Abb. 13: IRF5 schützt Mäuse vor einer tödlich verlaufenden intraperitonealen LGTV-Infektion
C57Bl/6 (n = 10) und IRF5^{-/-} (n = 5) Mäuse wurden mit 1×10^4 pfu LGTV i.p. infiziert. A, Untersuchung der Überlebenswahrscheinlichkeit mittels Kaplan-Meier Analyse. Unterschiede der Überlebenswahrscheinlichkeit sind signifikant ($p < 0,0001$). B, Prozentuale Änderungen des mittleren Körpergewichts im Verlauf der Infektion. Das Körpergewicht wurde am Tag 0 (Tag der Infektion) rechnerisch auf 100 % gesetzt. * $p = 0,0402$, ** $p \leq 0,005767$

Die Untersuchungen zeigen, dass IRF5 einen Einfluss auf die antivirale Wirtsabwehr von VSV- und LGTV-Infektionen ausübt. Beide Viren verursachen Anzeichen einer schweren Enzephalitis in IRF5^{-/-} Tieren.

3.2.2 IRF5 ist ein wichtiger Faktor zur Inhibierung der Virusreplikation

Nach i.n. Inokulation mit VSV kann es zu Infektionen des zentralen Nervensystems kommen, indem das Virus über die ORN in das Riechhirn und somit in das ZNS gelangt (162, 144). Daraufhin breitet sich das Virus über retrograden Transport in Neuronen und über die Blutbahnen aus (163).

Es sollte untersucht werden, ob IRF5 den Gewebetropismus von VSV beeinflusst. Deshalb wurde der Virustiter in verschiedenen Hirnregionen – *Bulbus olfactorius* (Riechhirn), Kleinhirn, Großhirn, *Truncus cerebri* (Hirnstamm) – sowie Leber, Lunge und Milz untersucht.

Hierfür wurden Mäuse mit 1×10^4 pfu VSV i.n. infiziert und am Tag 0, 2, 4 und 8 nach der Infektion getötet. Die zu untersuchenden Organe wurden entnommen, homogenisiert und die Konzentration von infektiösen Partikeln mittels Plaque Assay bestimmt.

Der *Bulbus olfactorius* ist in Wildtyp-Mäusen das erste Ziel von VSV nach i.n. Infektion (162). Am 2. Tag nach der Infektion konnte hier mit 4×10^6 pfu die höchsten Virustiter gemessen werden (vgl. Abb. 14, schwarze Symbole). Vom Riechhirn aus, erreichte das Virus andere Hirnareale, so dass im gesamten Gehirn geringe Viruskonzentrationen gemessen werden konnten. In den peripheren Organen konnte sich das Virus in der Lunge vermehren. Auch in den IRF5^{-/-} Tieren kann das Virus zunächst im Riech- und Großhirn und der Lunge replizieren (Abb. 14, rote Symbole). Vier Tage nach der Infektion sank der Virustiter in C57Bl/6 drastisch und war außerhalb des *Bulbus olfactorius* nicht mehr nachweisbar. In den IRF5-defizienten Tieren war zu diesem Zeitpunkt weiterhin eine geringe Viruslast in der Lunge messbar. Im Gehirn konnte sich VSV in rostral-lateraler Richtung weiter bis ins Kleinhirn ausbreiten. Am 8. Tag nach der Infektion konnte im gesamten Körper der Wildtyp-Mäuse kein replikationsfähiges Virus mehr detektiert werden. In der Peripherie der IRF5^{-/-} Tiere konnte zu diesem Zeitpunkt ebenfalls kein Virus detektiert werden. Im gesamten Gehirn hingegen wurden hohe Virustiter bis zu 10^8 pfu nachgewiesen.

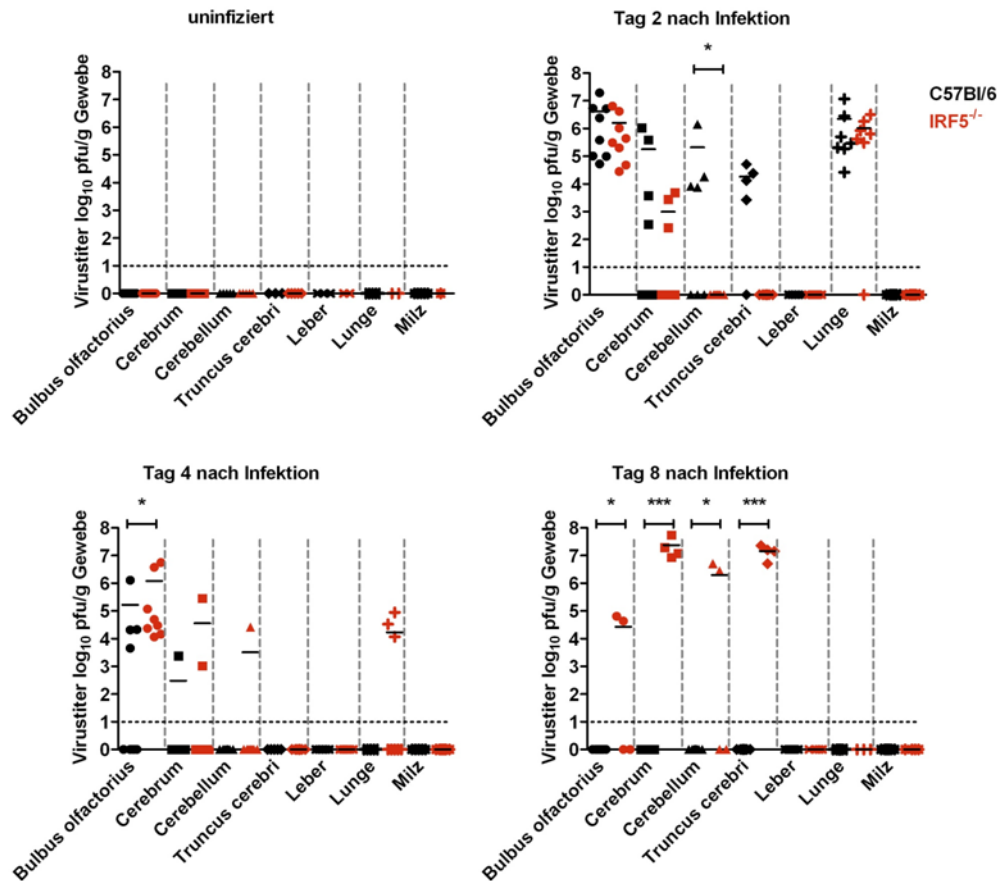


Abb. 14: IRF5 inhibiert die Replikation von VSV

C57BL/6 ($n = 5-12$) und IRF5^{-/-} ($n = 4-8$) Tiere wurden i.n. mit 10^4 pfu VSV infiziert. An Tag 0, 2, 4 und Tag 8 nach der Infektion wurden die Mäuse getötet und der Virustiter im *Bulbus olfactorius*, *Cerebrum*, *Cerebellum* und *Truncus cerebri*, Leber, Lunge und Milz mittels Plaque Assay bestimmt. * $p \leq 0,03072$, *** $p = 0,0001812$

Daraus lässt sich schließen, dass IRF5 die Virusreplikation vermindert. Allerdings scheint IRF5 in der Peripherie eine untergeordneter Rolle in der Virusabwehr zu spielen, da VSV in den Lungen von IRF5^{-/-} Mäuse nachgewiesen, aber trotzdem eliminiert werden kann. Im Gegensatz dazu scheint IRF5 im ZNS für eine adäquate antivirale Aktivität gegen VSV notwendig zu sein.

3.2.3 Der Verlust von IRF5 hat keinen Einfluss auf den Zelltropismus von VSV

VSV repliziert in Neuronen und breitet sich retrograd im ZNS aus (163). Eine mögliche Erklärung, warum sich VSV im Hirn von IRF5^{-/-} Tieren ungehindert verbreiten kann, ist ein veränderter Zelltropismus. Um die virale Replikation im Gehirn verfolgen zu können, wurden IRF5-defiziente Mäuse mit VSV-GFP infiziert. VSV-GFP

ist ein rekombinantes VSV-Virus, in dem zwischen das G- und L-Gen des Virus die mit VSV-Transkriptionsstart- und Zielsequenzen flankierte kodierende Sequenz von GFP eingefügt wurde (164). VSV-GFP zeigte in Überlebensexperimenten mit $IRF5^{-/-}$ Tieren eine geringere Pathogenität, was auf eine verminderte Virulenz zurückführbar ist (vgl. Abb. 15).

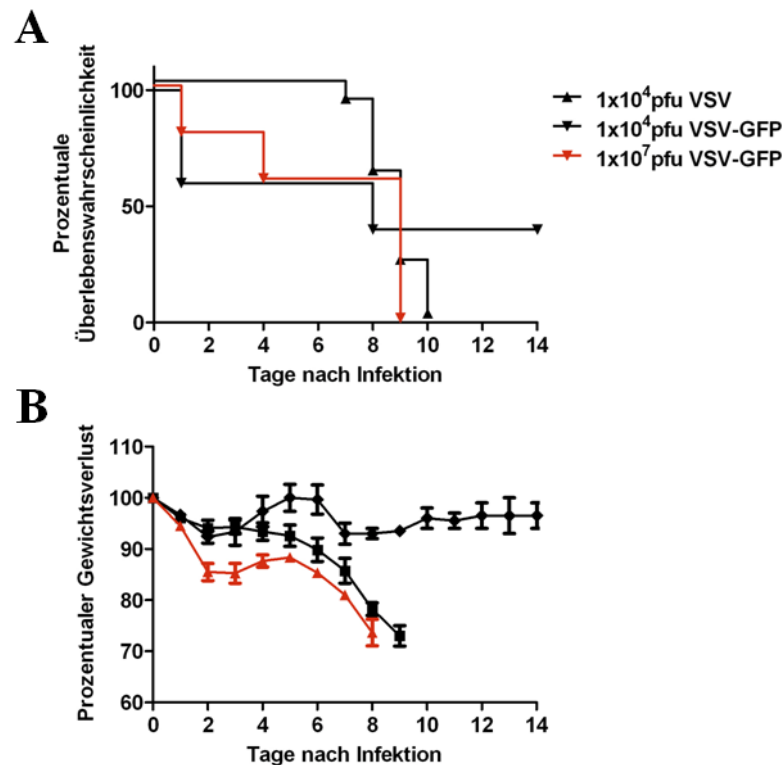


Abb. 15: VSV-GFP ist nicht so virulent wie VSV

$IRF5^{-/-}$ Mäuse wurden mit 1×10^4 pfu Wildtyp-VSV ($n = 13$), 1×10^4 pfu VSV-GFP ($n = 5$) und 1×10^7 pfu VSV-GFP ($n = 5$) i.n. infiziert. A, Untersuchung der Überlebenswahrscheinlichkeit mittels Kaplan-Meier Analyse. Unterschiede der Überlebenswahrscheinlichkeit sind signifikant ($p < 0,0001$). B, Prozentuale Änderungen des mittleren Körpergewichts im Verlauf der Infektion. Das Körpergewicht wurde am Tag 0 (Tag der Infektion) rechnerisch auf 100 % gesetzt.

Diese könnte daraus resultieren, dass aufgrund der Insertion des Fremdgens die Transkription des L-Proteins vermindert wird. Um eine Infektionsdosis an VSV-GFP zu ermitteln, die den selben Krankheitsverlauf erzeugt wie 1×10^4 pfu Wildtyp-VSV, wurden $IRF5^{-/-}$ Mäuse mit unterschiedlichen Mengen VSV-GFP infiziert und ihr Überleben 14 Tage lang beobachtet.

Mäuse, die mit 1×10^7 pfu VSV-GFP i.n. infiziert wurden, zeigten einen ähnlichen Krankheitsverlauf wie Tiere, die mit 1×10^4 pfu Wildtyp-VSV i.n. inokuliert wurden.

Ab dem 5. Tag waren sie weniger aktiv, bekamen struppiges Fell und starben nach 9 Tagen. Die folgenden Infektionen mit VSV-GFP wurden daher mit einer pfu von 1×10^7 durchgeführt.

Um die infizierten Zellen zu identifizieren, wurden die Tiere an Tag 8 nach der Infektion mit PFA perfundiert, die Gehirne präpariert, sagittal geschnitten, gefärbt und mikroskopisch analysiert.

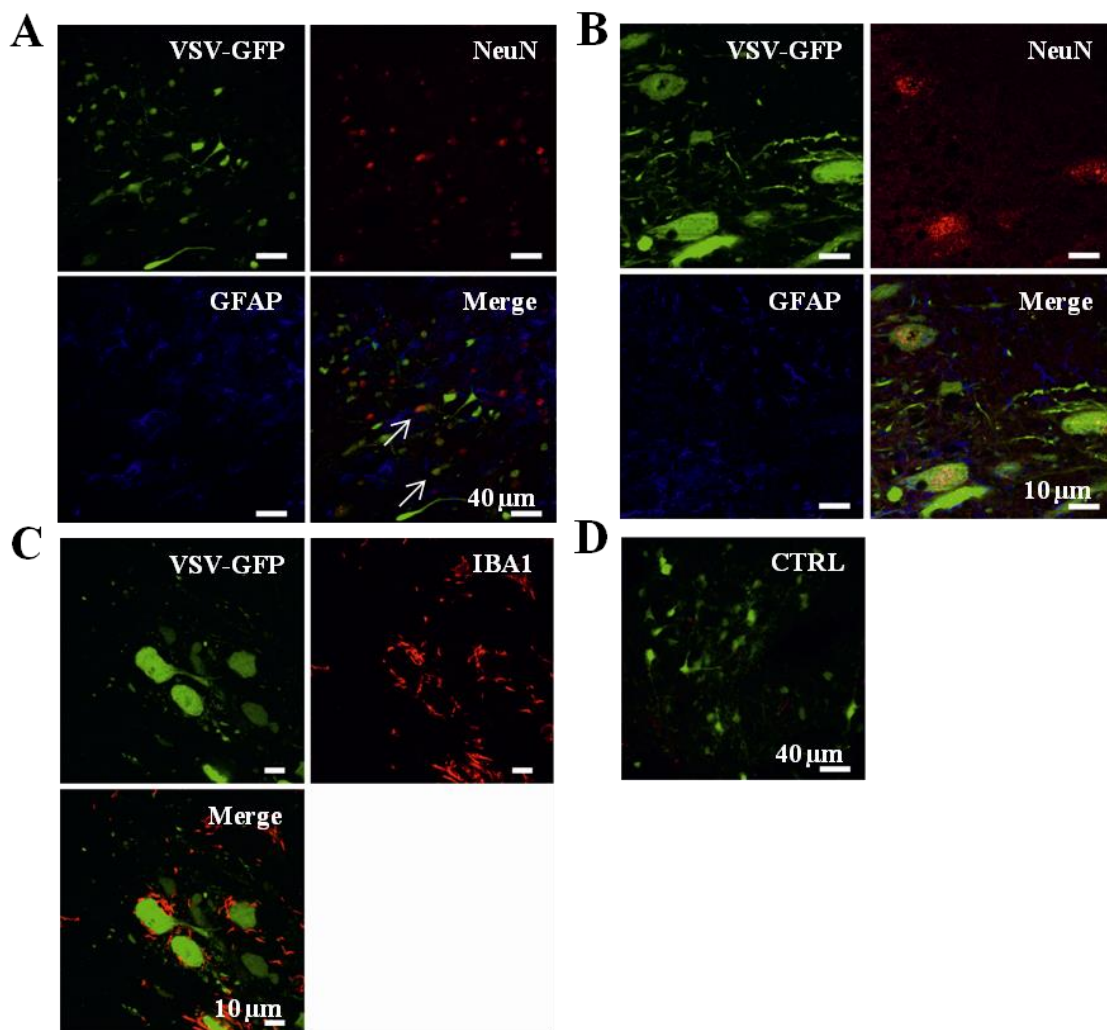


Abb. 16: Der Verlust von IRF5 hat keinen Einfluss auf den Zelltropismus von VSV

IRF5^{-/-} Mäuse wurden mit 1×10^7 pfu VSV-GFP intranasal infiziert. Am 8. Tag nach der Infektion wurden die Mäuse mit PFA perfundiert. Sagittale Hirnschnitte wurden mit Antikörpern gegen NeuN (Neurone), GFAP (Astrozyten) und IBA1 (Mikroglia) gefärbt. A, Gezeigt ist ein repräsentativer Ausschnitt des Mittelhirns, gefärbt mit NeuN und GFAP in 40-facher Vergrößerung. Pfeile zeigen infizierte Zellen. B, Gezeigt ist ein repräsentativer Ausschnitt des Mittelhirns, gefärbt mit NeuN und GFAP in 63-facher Vergrößerung. C, Gezeigt ist ein repräsentativer Ausschnitt des Mittelhirns gefärbt mit IBA1 in 63-facher Vergrößerung. D, Kontrollfärbung ohne Primärantikörper in 40-facher Vergrößerung.

Wie in Abb. 16 zu sehen kolokalisiert das neuronale Kernprotein NeuN mit GFP in vielen Teilen des Gehirns. Im Gegensatz dazu konnten im gesamten Gehirn keine Überlagerungen mit dem astrozytären Intermediärfilament GFAP und dem Mikroglia-Marker IBA1 gesehen werden.

Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass der Tropismus von VSV durch den Verlust von IRF5 nicht beeinflusst wird und das Virus weiterhin hauptsächlich Neurone infiziert.

3.2.4 IRF5 ist an der Induktion von IFN beteiligt

IRF5 wirkt neben IRF3 und IRF7 als Transkriptionsfaktor in Virus-induzierten Signalwegen. Seine Bedeutung in der systemischen Expression von IFN ist dabei widersprüchlich (2, 3). Um die IFN-Induktion in IRF5^{-/-} Mäusen zu überprüfen, wurden C57Bl/6 und IRF5 defiziente Mäuse i.n. mit VSV infiziert. Den Tieren wurde an Tag 0, 2, 4 und 8 nach der Infektion Blut entnommen und Serum präpariert. Der IFN α -Titer im Serum wurde mittels ELISA bestimmt.

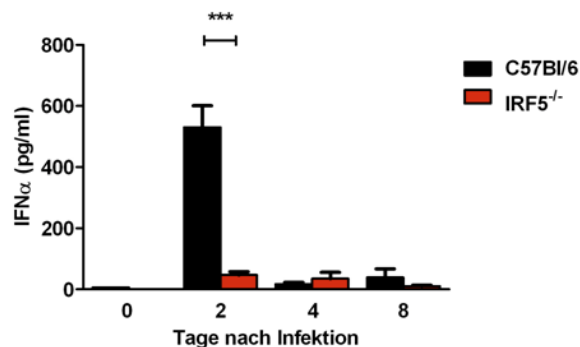


Abb. 17: IRF5^{-/-} Tiere produzieren geringere Mengen an IFN α nach i.n. VSV-Infektion

C57Bl/6 (n = 7-8) und IRF5^{-/-}-Mäuse (n = 5-8) wurden mit 1×10^4 pfu VSV i.n. infiziert. An Tag 0, 2, 4, und 8 nach der Infektion wurde den Mäusen Blut entnommen. Die IFN α -Konzentration im Serum wurde mit Hilfe eines ELISAs bestimmt. p = 0,000931

Am 2. Tag nach der Infektion konnte im Serum von Wildtyp-Tieren mit 531 pg/ml die höchste Konzentration an IFN α detektiert werden (vgl. Abb. 17). Im Vergleich dazu wurden in IRF5^{-/-} Tieren signifikant geringere Mengen an IFN α im Serum gemessen (47 pg/ml). Zu späteren Zeitpunkten konnten nur geringe Konzentrationen bestimmt

werden, dabei gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen Wildtyp- und IRF5^{-/-} Mäusen.

Diese Experimente bestätigen die Voruntersuchungen anderer Gruppen (2, 4, 5), die zeigten, dass IRF5 essentiell für die vollständige Produktion von IFN in der Peripherie ist.

3.2.5 Einfluss von IRF5 auf die Expression von ISGs

IFN sind die erste Abwehr viraler Infektionen. Ihre Wirkung wird über die Induktion von ISGs vermittelt. IRF7 ist dabei wichtig für die Amplifikation der IFN-Antwort. Andere ISGs üben direkte antivirale Funktionen aus. So konnte gezeigt werden, dass Ifit2, ISG20, Mx2, Rsad2 und Usp18 direkt einen Einfluss auf die Replikation von VSV haben (77, 148, 147, 98).

Es sollte untersucht werden, welchen Einfluss IRF5 auf die Expression von ISGs ausübt und somit zur Etablierung eines antiviralen Status in der Zelle notwendig ist. Dazu wurden die Mäuse mit 1×10^4 pfu VSV infiziert und die Expression verschiedener ISGs mittels RT-PCR in der Lunge und dem Gehirn ermittelt (vgl. Abb. 18, Abb. 19).

In den Organen der C57Bl/6 Mäusen steigt die Expression der untersuchten ISGs parallel zur Produktion des IFN α im Serum bis 48 h nach der Infektion kontinuierlich an.

In den IRF5^{-/-} Tieren können Unterschiede in der Kinetik der Expression der ISGs in den Organen erkannt werden. Im Gehirn folgt der Verlauf der Expression der verschiedenen Gene denen in Wildtyp-Mäusen und steigt bis 48 h nach der Infektion an. Auffällig dabei ist, dass alle Gene, mit Ausnahme von Viperin, in den transgenen Tieren tendenziell stärker exprimiert werden als in den Wildtyp-Mäusen. Viperin wird in den C57Bl/6 höher exprimiert (Abb. 18 E). Die Induktion der ISGs fällt bei den IRF5^{-/-} Mäuse deutlich geringer aus, was auf die signifikant höhere Basalexpression in diesen Tieren zurückzuführen ist.

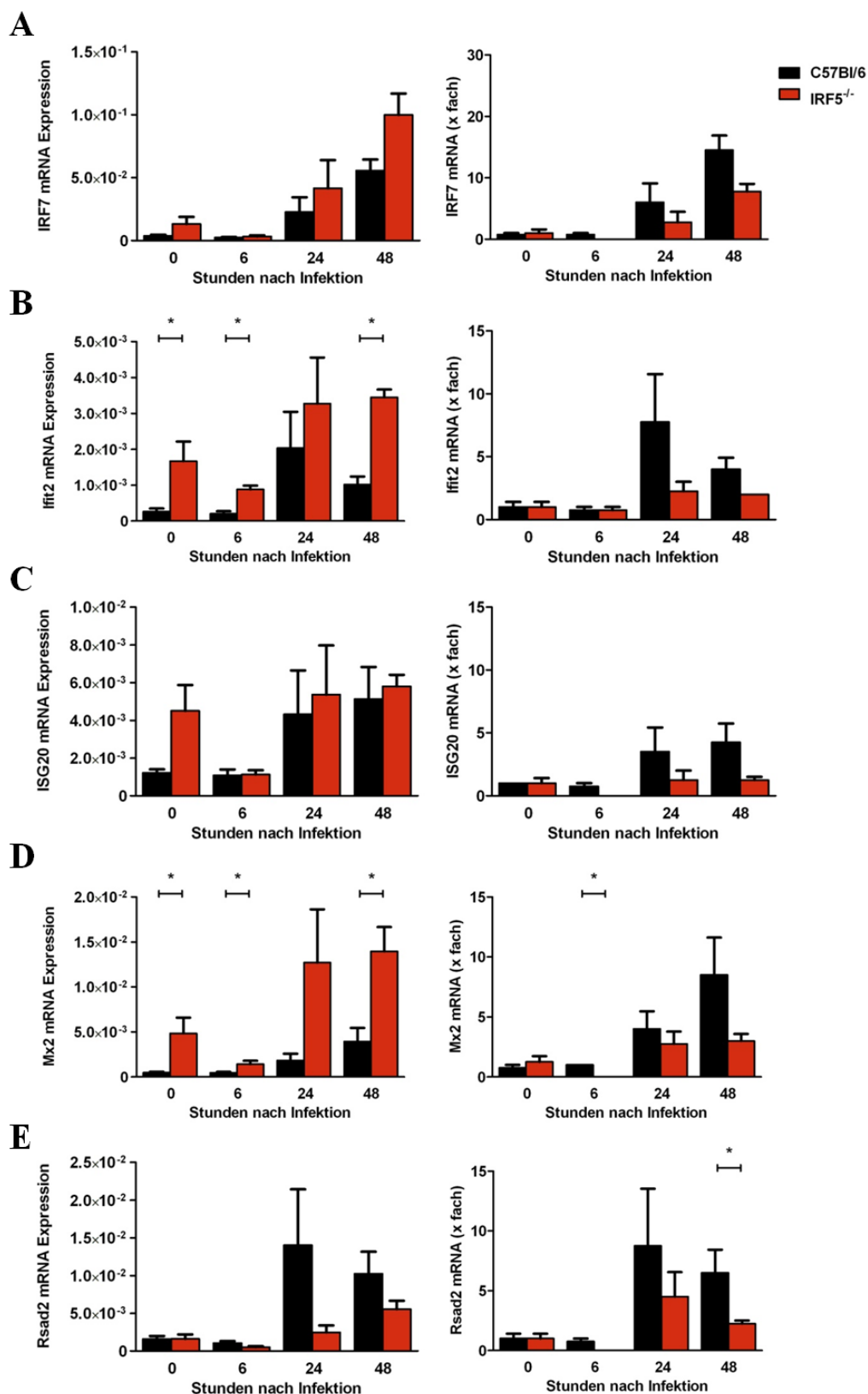


Abb. 18: Expression von ISGs nach VSV-Infektion im Gehirn

C57Bl/6 und IRF5^{-/-} Mäuse wurden mit 1×10^4 pfu VSV infiziert, nach 0, 6, 24 bzw. 48 h getötet und das Gehirn entnommen. Nach der Isolation der Gesamt-RNA wurde die absolute Expression (linke Spalte) von IRF7 (A), Ifit2 (B), ISG20 (C), Mx (D) und Rsad2 (E) normalisiert auf das Referenzgen β -Aktin mittels RT-PCR ermittelt. In der rechten Spalte ist jeweils die relative Induktion des Gens, bezogen auf die mittlere Expression am Tag 0 (Basalexpression) angegeben. $n = 4$; * $p \leq 0,03719$

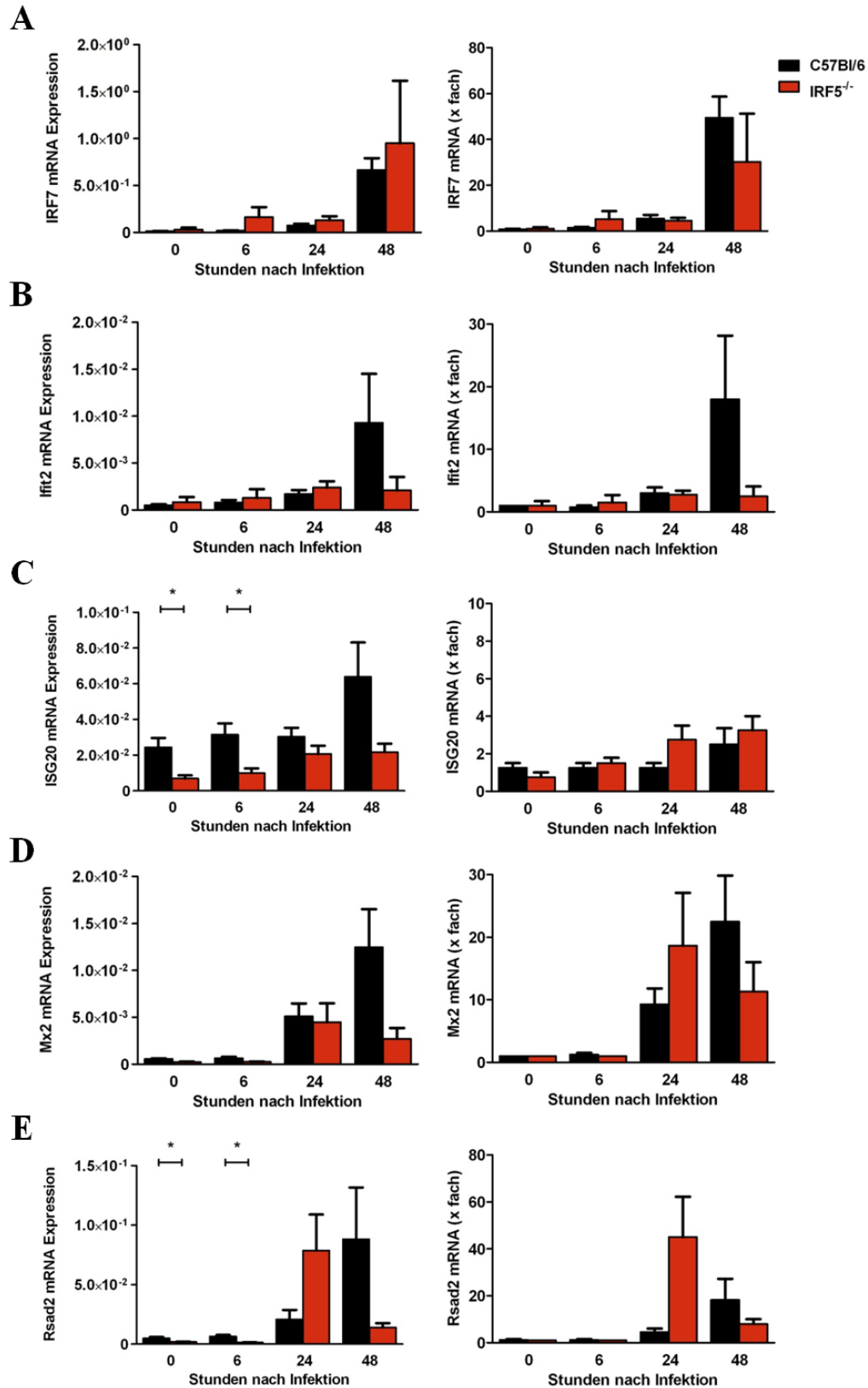


Abb. 19: Expression von ISGs nach VSV-Infektion in der Lunge

C57Bl/6 und IRF5^{-/-} Mäuse wurden mit 1 x 10⁴ pfu VSV infiziert, nach 0, 6, 24 bzw. 48 h getötet und die Lunge entnommen. Nach der Isolation der Gesamt-RNA wurde die absolute Expression (linke Spalte) von IRF7 (A), Ifit2 (B), ISG20 (C), Mx (D) und Rsad2 (E) normalisiert auf das Referenzgen β -Aktin mittels RT-PCR ermittelt. In der rechten Spalte ist jeweils die relative Induktion des Gens, bezogen auf die mittlere Expression am Tag 0 (Basalexpression) angegeben. n=4; * p \leq 0,04706

In der Lunge von IRF5^{-/-} Mäusen verläuft die Expression der ISGs abweichend zum Gehirn. Bis 24 h nach der Infektion ähneln sich die Expressionslevel der ISGs bei C57Bl/6 und IRF5-defizienten Mäusen. Ein Unterschied in der Basalexpression konnte in der Lunge nicht beobachtet werden. Bei IRF7, Ifit2 und ISG20 steigt die Expression bis 48 h weiter an (Abb. 19 A, B, C). Bei Mx2, Rsad2 und Usp18 (Daten nicht gezeigt) hingegen erreicht die Expression nach 24 h ihr Maximum und fällt bis 48 h deutlich ab (Abb. 19 D, E). Auch hier ist Rsad2 besonders zu erwähnen. Während die Rsad2-Expression bei Wildtyp-Mäusen über 24 h kontinuierlich ansteigt, beobachtet man bei IRF5^{-/-} Mäusen einen sprunghaften Anstieg nach 24 h, so dass die Expression in den transgenen Tieren um den Faktor 4 höher ist als in Wildtyp-Mäusen. Nach 48 h fällt die Expressionsmenge in den IRF5^{-/-} Mäusen wieder, so dass Wildtyp-Tieren eine 6-fach höhere Expression zeigen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in IRF5^{-/-} Tieren antivirale Genprodukte in der Lunge und im Gehirn exprimiert werden.

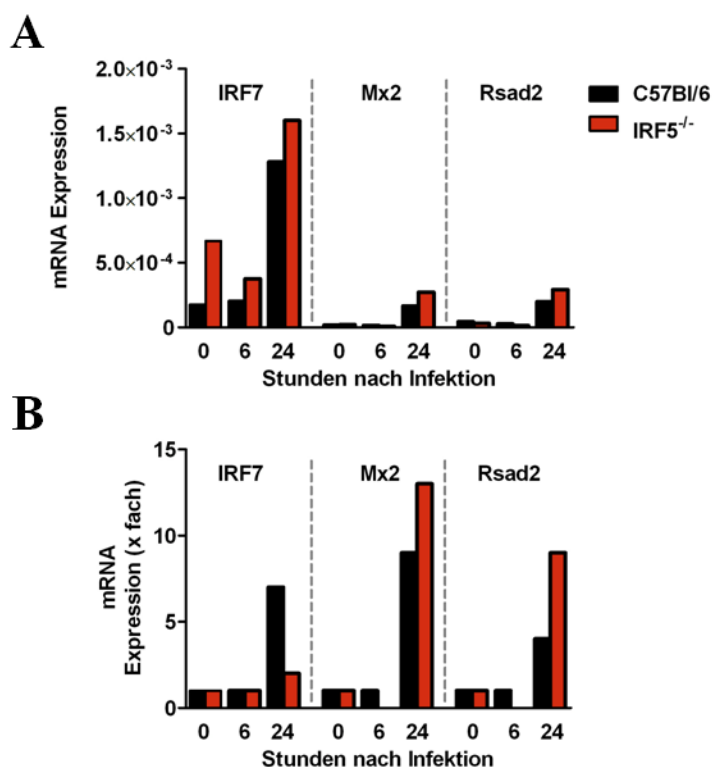


Abb. 20: Expression von ISGs in MEFs (nach 165)

C57Bl/6 und IRF5^{-/-} MEFs wurden mit einer MOI von 0,001 an VSV infiziert. Die Zellen wurden nach 0 h, 6 h und 24 h geerntet, die Gesamt-mRNA isoliert. A, Die absolute Expression von IRF7, Mx und Rsad2 normalisiert auf das Referenzgen β -Aktin wurde mittels RT PCR ermittelt. B, Angegeben ist die relative Induktion des Gens, bezogen auf die mittlere Expression am Tag 0 (Basalexpression).

Inwieweit diese ausreichen um die Virusreplikation von VSV zu hemmen, wurde in Zellkultur untersucht. Dazu wurden embryonale Fibroblasten (MEFs) und Makrophagen aus Wildtyp- und IRF5^{-/-} Mäusen gewonnen und jeweils mit einer Multiplizität der Infektion (MOI) von 0,001 infiziert. Genexpressionsanalysen in MEFs zeigten, dass die Expression der ISGs über 24 h ansteigt (Abb. 20, 165). Dabei liegt die Expressionshöhe der ISGs in IRF5^{-/-} Zellen tendenziell höher als in Wildtyp-Fibroblasten.

Des Weiteren wurde der Titer an infektiösen Viruspartikeln im Zellüberstand mittels Plaque Assay ermittelt (166). Das Virus kann sich in Wildtyp-Fibroblasten nur langsam vermehren. In IFNAR defizienten Zellen repliziert das Virus uneingeschränkt und erreicht 24 h nach der Infektion 200-fach höhere Virustiter als in den Wildtyp-Fibroblasten. Auch in den Zellen aus den IRF5^{-/-} Mäusen kann sich das Virus besser replizieren als in den Wildtyp-MEFs (44-fach), wobei der Effekt nicht so auffällig wie in den IFNAR^{-/-} Zellen ist. In Makrophagen ist dieser Unterschied deutlicher erkennbar (Abb. 21 B).

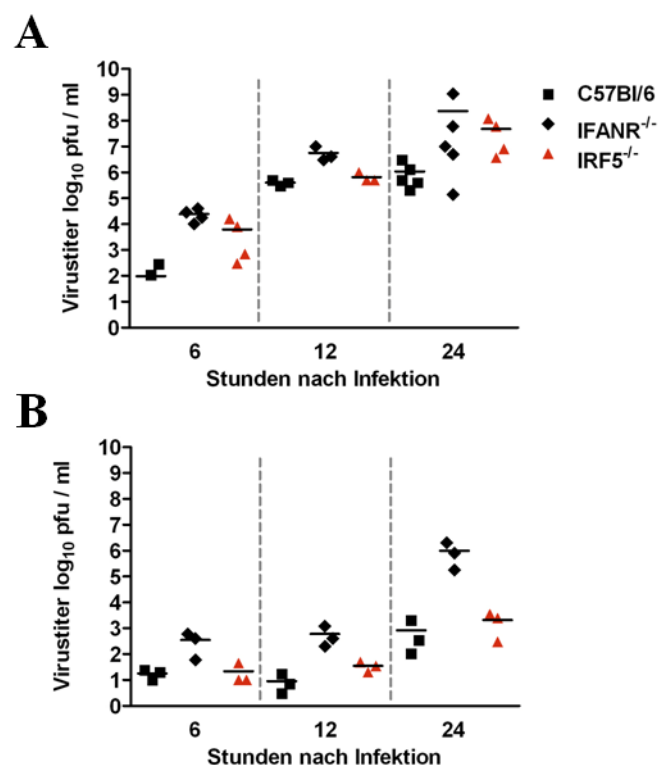


Abb. 21: Bestimmung der Replikation von VSV in IRF5^{-/-} MEFs und Makrophagen (nach 166)
Immortalisierte MEFs (A) und Knochenmark-generierte Makrophagen (B) wurden aus C57BL/6, IFNAR^{-/-} und IRF5^{-/-} Tieren isoliert und mit VSV infiziert MOI (0,001). Nach 6, 12 und 24 h wurden die Zellüberstände abgenommen und der Titer an infektiösen VSV-Partikeln mittels Plaque Assay bestimmt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Verlust an IRF5 *in vitro* nur einen geringen Einfluss auf den Aufbau eines antiviralen Status in der Zelle hat. *In vivo* ist die Expression an IFN im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen deutlich vermindert. Allerdings sind Zellen in der Lunge und im Gehirn trotz des Defekts eingeschränkt in der Lage antivirale Gene zu induzieren. Dennoch sind IRF5^{-/-} Mäuse nicht in der Lage VSV im Gehirn zu bekämpfen. Dies legt die Schlussfolgerung nahe, dass IRF5 ebenfalls einen Einfluss auf Komponenten des angeborenen Immunsystems ausübt, welche für die Kontrolle der VSV-Infektion notwendig sind.

3.2.6 Immunmodulatorische Wirkung von IRF5

Neben IFN sind verschiedene Immunzellen an der Induktion von Entzündungsreaktionen und der Eliminierung infizierter Zellen beteiligt. Es ist bereits bekannt, dass IRF5 an der Differenzierung von B-Zellen und Makrophagen beteiligt ist (73, 74).

Um den Einfluss von IRF5 auf Immunzellen zu untersuchen, wurden die Anzahl und der Anteil mehrerer Lymphozyten und Monozyten vor und nach der Infektion in verschiedenen Geweben untersucht. Die Immunzellen wurden aus dem Gehirn, der Lunge und der Milz isoliert und anhand von Oberflächenmolekülen mittels Durchflusszytometrie identifiziert: B220⁺ Zellen (B-Lymphozyten), CD3⁺CD4⁺ (CD4⁺ T-Lymphozyten), CD3⁺CD8⁺ (CD8⁺ T-Lymphozyten) und CD11b⁺ Zellen (Makrophagen) bzw. CD11b^{high}CD45^{low} (Monozyten) und CD11b^{high}CD45^{high} (aktivierte Mikroglia).

Die Milz ist ein primäres lymphatisches Organ und somit an der Speicherung von Immunzellen beteiligt. Die FACS-Analyse der Immunzellen in diesem Organ zeigen, dass IRF5^{-/-} Mäuse in der Homöostase signifikant weniger B- und T-Zellen besitzen als Wildtyp-Tiere (vgl. Abb. 22 A, C, D). Die Anzahl der Makrophagen in IRF5 defizienten Mäusen unterscheidet sich nicht von C57Bl/6 (vgl. Abb. 22 B). Am 8. Tag nach der Infektion konnten keine Unterschiede mehr in der Anzahl der Immunzellen bestimmt werden.

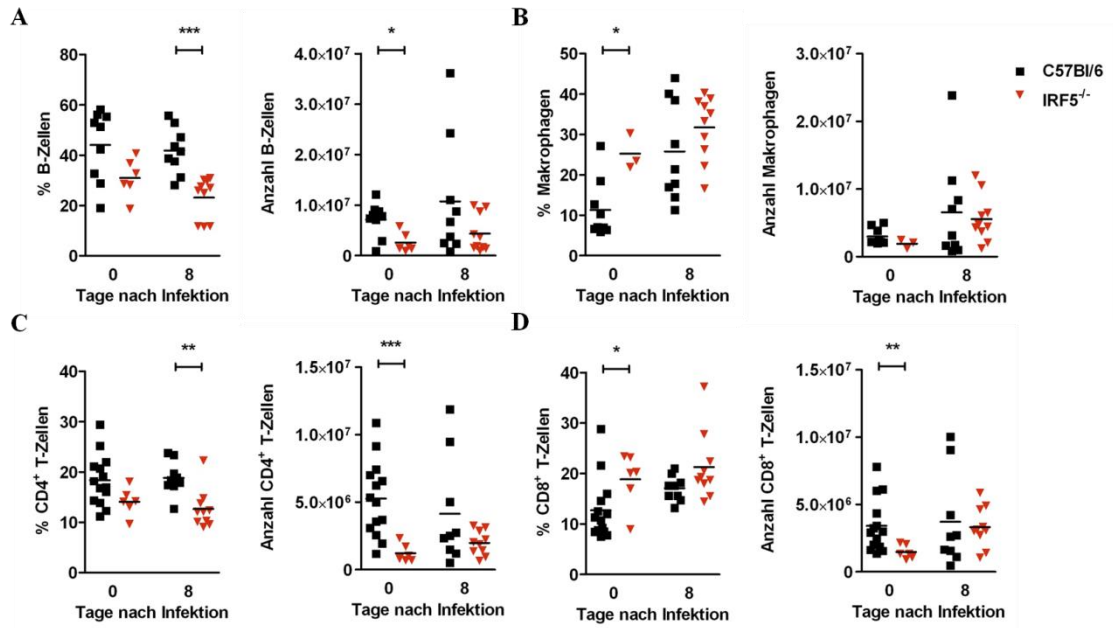


Abb. 22: Zusammensetzung der Immunzellen in der Milz nach VSV-Infektion

C57Bl/6 (n = 9-14) und IRF5^{-/-} Mäuse (n = 6-10) wurden mit 1×10^4 pfu VSV infiziert. Die Milzen wurden am Tag 0 und 8 nach der Infektion entnommen und Immunzellen isoliert. Mittels Durchflusszytometrie wurde die Anzahl und der Anteil von A, B-Lymphozyten B, Makrophagen, C, CD4⁺ T-Lymphozyten und D, CD8⁺ T-Lymphozyten an der Splenozytenpopulation bestimmt. *p ≤ 0,04076, **p ≤ 0,00645, ***p ≤ 0,0006991

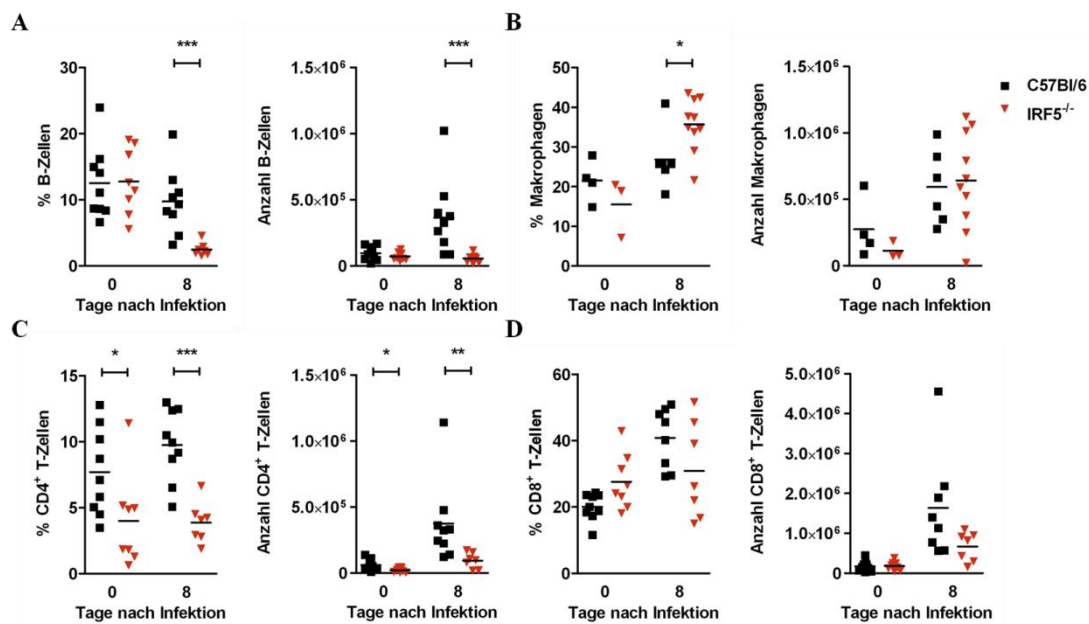


Abb. 23: Zusammensetzung der Immunzellen in der Lunge nach VSV-Infektion

C57Bl/6 (n = 4-9) und IRF5^{-/-} Mäuse (n = 3-10) wurden mit 1×10^4 pfu VSV infiziert. Die Lungen wurden am Tag 0 und 8 nach der Infektion entnommen und Immunzellen isoliert. Mittels Durchflusszytometrie wurde die Anzahl und der Anteil von A, B-Lymphozyten B, Makrophagen, C, CD4⁺ T-Lymphozyten und D, CD8⁺ T-Lymphozyten an der Gesamtpopulation von Immunzellen bestimmt. *p ≤ 0,04463, **p = 0,002098, ***p ≤ 0,0006993

Auch in der Lunge von uninfizierten IRF5^{-/-} Mäuse findet man weniger B- und T-Lymphozyten als in Wildtyp-Mäusen (vgl. Abb. 23 A, C, D). Am Tag 8 nach der Infektion ist kein Unterschied mehr in der Anzahl der untersuchten Immunzellen zwischen C57Bl/6 und IRF5^{-/-} Mäusen erkennbar.

In den Gehirnen naiver Wildtyp- und IRF5^{-/-} Mäuse konnten nur wenige Immunzellen detektiert werden (Abb. 24). Im gesunden, nicht-infizierten Gehirn findet man in der Regel keine immunologischen Aktivitäten. Aktivierte B- und T-Zellen können in das Gehirn gelangen, finden sie dort jedoch kein passendes Antigen vor, verlassen sie das ZNS wieder oder sterben durch Apoptose.

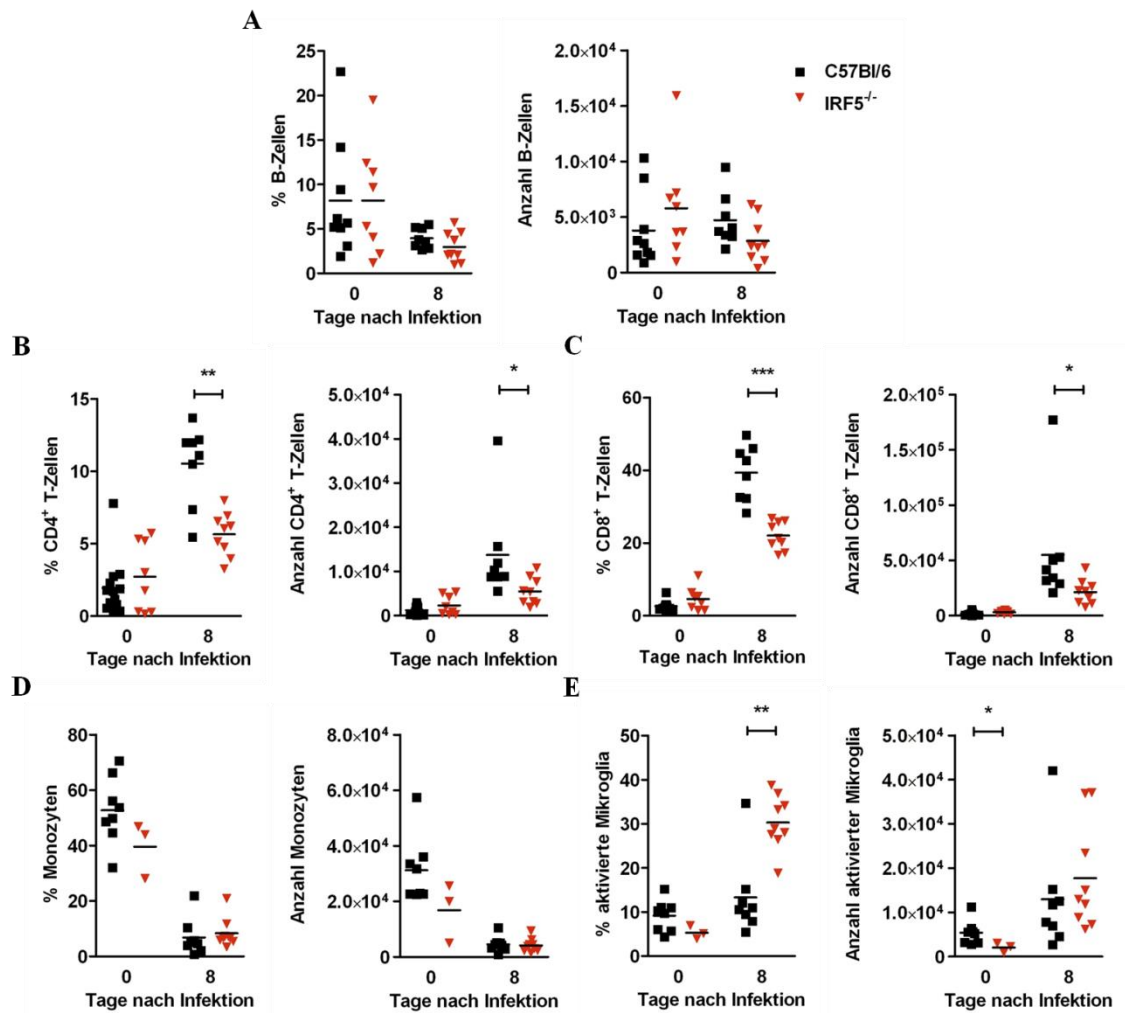


Abb. 24: Zusammensetzung der Immunzellen im Gehirn nach VSV-Infektion

C57Bl/6 (n = 8-13) und IRF5^{-/-} Mäuse (n = 3-9) wurden mit 1 x 10⁴ pfu VSV infiziert. Die Gehirne wurden am Tag 0 und 8 nach der Infektion entnommen und Immunzellen isoliert. Mittels Durchflusszytometrie wurde die Anzahl und der Anteil von A, B-Lymphozyten B, CD4⁺ T-Lymphozyten C, CD8⁺ T-Lymphozyten D, Monozyten und E, aktivierter Mikroglia an der Gesamtpopulation von Immunzellen bestimmt. *p ≤ 0,01522, **p ≤ 0,004506, ***p = 0,00008227

Im Gehirn infizierter IRF5^{-/-} Mäuse ist ebenfalls eine verminderte Anzahl an T-Zellen zu beobachten. Die Anzahl an B-Zellen und Makrophagen ist jedoch in IRF5^{-/-}-Mäusen so hoch wie in C57Bl/6. Mikroglia sind residente Makrophagen des Gehirns und maßgeblich an der Immunabwehr beteiligt. Die Schädigung von Neuronen führt zu einer Aktivierung von Mikroglia. Daraufhin sind diese in der Lage durch die Produktion von Zytokinen und Chemokinen zur Anlockung und Aktivierung anderer Immunzellen beizutragen. In den Gehirnen von IRF5^{-/-} Mäusen ist der Prozentsatz an aktivierten Mikroglia im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen massiv erhöht.

Diese Untersuchungen weist darauf hin, dass IRF5 an der Entwicklung von B- und T-Lymphozyten beteiligt ist.

3.2.7 IRF5^{-/-} Mäuse haben einen Defekt in der humoralen Immunantwort

IRF5-defiziente Mäuse weisen einen Defekt in der B-Lymphozyten-Entwicklung auf. Mit etwa 14 Monate zeigen IRF5^{-/-} Mäuse einen veränderten B-Zell Phänotyp, welcher durch ein verringertes Level an CD138⁺B220⁺ B-Zellen, eine starke Akkumulation an großen CD19⁺B220⁻ Zellen (Splénomegalie) und eine verminderte Blimp-1 Expression charakterisiert ist. Dies deutet auf einen Defekt in der Plasmazell-Entwicklung in alten IRF5^{-/-} Mäusen hin (74). In dieser Arbeit wurden nur Mäuse im Alter zwischen 6 und 12 Wochen verwendet, die keine phänotypischen Veränderungen der Milz im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen aufwiesen. Mittels FACS-Analysen konnte jedoch gezeigt werden, dass IRF5^{-/-} weniger B-Zellen besitzen. Da neutralisierende Antikörper an der Abwehr einer VSV Infektion beteiligt sind, sollte der Einfluss von IRF5 auf die Ausbildung der humoralen Immunantwort gegen VSV untersucht werden.

Dazu wurden Wildtyp-Mäuse und IRF5^{-/-} Mäuse mit 1×10^4 pfu VSV infiziert und ihnen am Tag 4 und 8 nach der Infektion Blut entnommen. Daraufhin wurde der Titer an IgM- und IgG-Antikörpern aus dem Serum mittels Neutralisierungsassay wie von Charan und Zinkernagel beschrieben untersucht (167).

Am 4. Tag nach der Infektion sind im Serum von Wildtyp- und IRF5^{-/-} Mäusen nur IgM-Antikörper nachweisbar (vgl. Abb. 25). Im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen produzieren IRF5-defiziente Mäuse jedoch signifikant weniger Antikörper. Nach 8 Tagen ist in C57Bl/6 der Subklassenwechsel zu IgG-Antikörpern vollständig

abgeschlossen. In den IRF5^{-/-} Mäusen konnten sowohl IgM- als auch IgG Antikörper nachgewiesen werden.

Diese Ergebnisse zeigen, dass IRF5^{-/-} Mäuse einen Defekt in der Produktion von Antikörpern aufweisen. Der Subklassenwechsel von IgM zu IgG Antikörpern scheint verlangsamt, oder gestört zu sein, was auf einen Defekt in der B-Zell-Immunantwort hinweist.

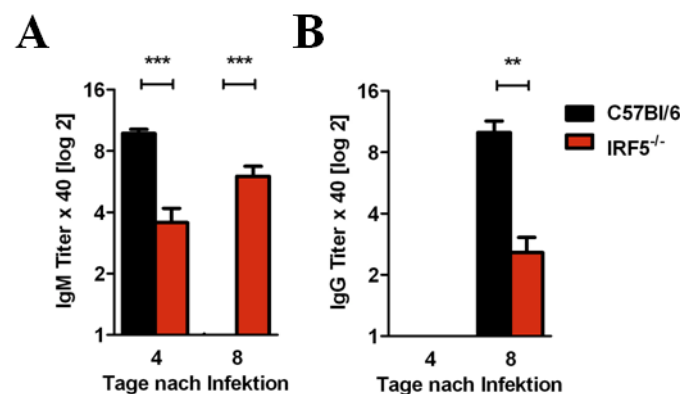


Abb. 25: IRF5^{-/-} Mäuse zeigen einen Defekt in der humoralen Immunantwort

C57BL/6 und IRF5^{-/-} Mäuse wurden i.n. mit 1×10^4 pfu VSV infiziert. Am 4. und 8. Tag nach der Infektion wurde den Mäusen Blut entnommen und die IgM- (A) und IgG- (B) spezifischen VSV-neutralisierenden Antikörper bestimmt. ** $p = 0,008832$, *** $p \leq 0,0008899$

3.2.8 Der Defekt in der humoralen Immunantwort ist nicht ursächlich für die letale Infektion mit VSV

Frühere Studien zeigten, dass B-Zell-defiziente Mäuse hoch suszeptibel gegenüber akuten Infektionen zytopathisches Viren, wie VSV, sind (168, 169). Aus diesen Studien lässt sich schließen, dass B-Zell-produzierte Antikörper ein kritischer Faktor zur Bekämpfung einer VSV-Infektion sind. Um zu überprüfen, ob IRF5^{-/-} Mäuse wegen verringerter Produktion an VSV-neutralisierenden IgM- und IgG-Antikörper suszeptibler gegenüber VSV sind, sollten ihnen Wildtyp-B-Zellen transferiert werden.

Dazu wurden ruhende, naive B-Zellen mittels negativer Selektion von CD43 exprimierenden Zellen durch magnetische Separation aus den Milzen von C57Bl/6 CD45.1 Mäusen isoliert. Diese Mäuse gleichen genetisch Wildtyp-Mäusen des Stammes C57Bl/6, sie exprimieren jedoch ein anderes CD45-Allel. Durch Verwendung

dieser Tiere können die transferierten Zellen von denen des Empfängers unterschieden werden.

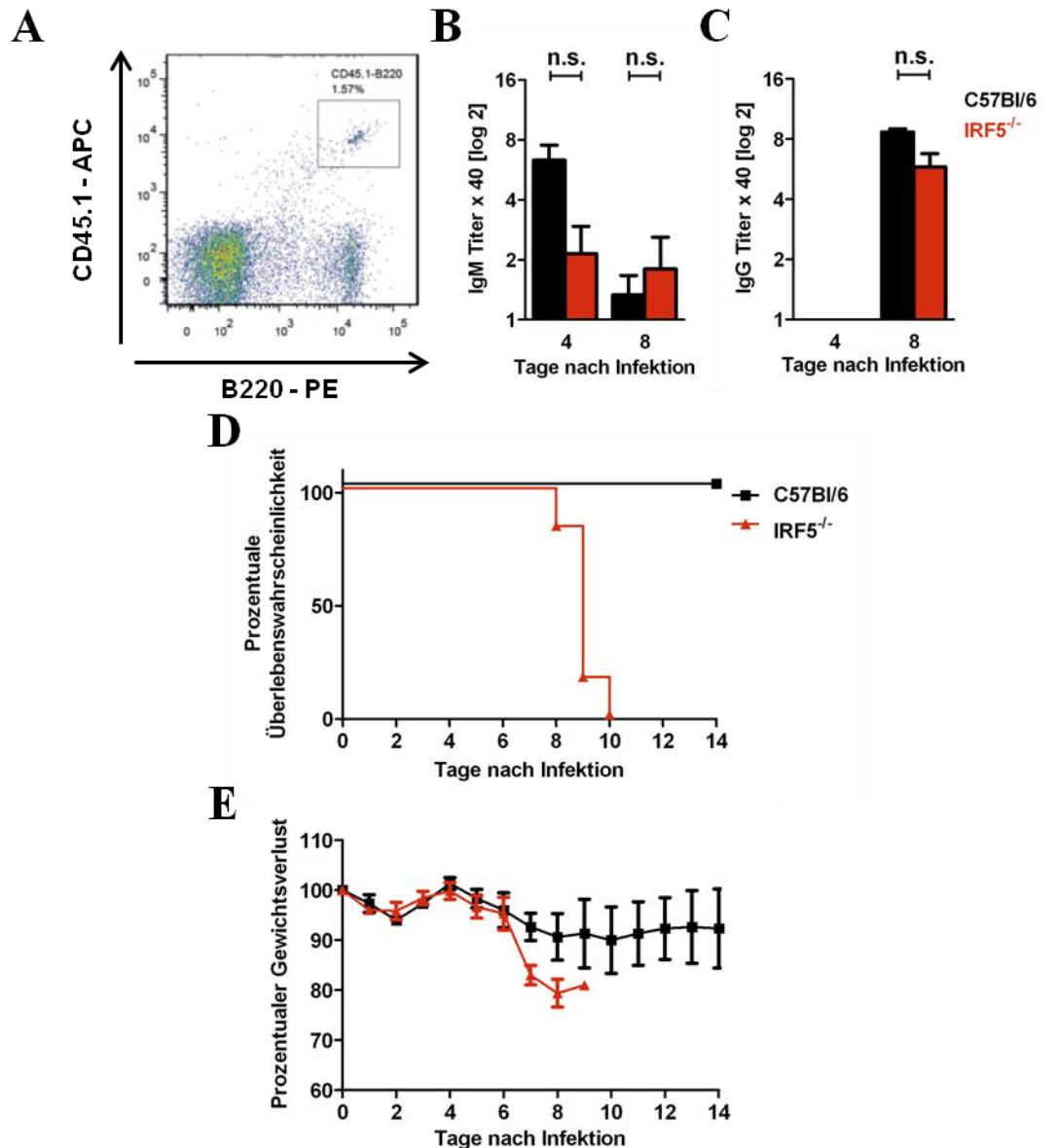


Abb. 26: Die verringerte Menge VSV-neutralisierender Antikörper in IRF5^{-/-} Mäusen ist nicht ursprünglich für die Suszeptibilität gegenüber VSV-Infektionen

B-Zellen wurden mittels magnetischer Separation aus C57Bl/6 CD45.1 Mäusen isoliert. 5×10^6 B-Zellen wurden i.v. in C57Bl/6 und IRF5-Mäuse injiziert. Am 2. Tag nach dem Transfer wurden die Mäuse i.n. mit 1×10^4 pfu VSV infiziert. A, Der erfolgreiche Transfer von CD45.1 B-Zellen wurde in der Milz der Rezipienten mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Am 4. und 8. Tag nach der Infektion wurde den Mäusen Blut entnommen und die IgM- (B) und IgG- (C) spezifischen VSV-neutralisierenden Antikörper bestimmt. D, Untersuchung der Überlebenswahrscheinlichkeit mittels Kaplan-Meier Analyse. Unterschiede der Überlebenswahrscheinlichkeit sind signifikant ($p < 0,0001$). E, Prozentuale Änderungen des mittleren Körpergewichts im Verlauf der Infektion. Das Körpergewicht wurde am Tag 0 (Tag der Infektion) rechnerisch auf 100 % gesetzt. n.s. = nicht signifikant

5×10^6 B-Zellen wurden intravenöse in die Schwanzvene von C57Bl/6 (CD45.2) und IRF5^{-/-} Mäuse injiziert. Nach Beendigung des Experiments wurde der Anteil transferierter B-Zellen in der Milz mittels Durchflusszytometrie untersucht. Bis zu 1,6 % der Splenozyten konnten als transferierte CD45.1 B-Zellen identifiziert werden, so dass ein erfolgreicher Transfer angenommen werden kann (vgl. Abb. 26 A). Am 2. Tag nach dem B-Zell-Transfer wurden die Mäuse mit 1×10^4 pfu VSV i.n. infiziert und ihr Überleben 14 Tage lang beobachtet.

Um zu untersuchen, ob der Transfer der B-Zellen den Mangel der Produktion von neutralisierenden Antikörpern in IRF5^{-/-} Mäusen ausgleicht, wurde den Tieren am 4. und 8. Tag nach der Infektion Blut entnommen und auf die Produktion neutralisierender Antikörper untersucht. Tendenziell hatten IRF5^{-/-} Mäuse im Vergleich zu C57Bl/6 Tieren am Tag 4 weiterhin einen niedrigeren IgM-Titer, wobei der Unterschied nicht statistisch signifikant war (Abb. 26 B). Am Tag 8 konnten keine Unterschiede mehr in der Konzentration der IgM- bzw. IgG-Antikörper zwischen den beiden Maus-Stämmen gefunden werden (Abb. 26 B, C). Trotz dieser wiederhergestellten humoralen Immunantwort verstarben IRF5^{-/-} Mäuse innerhalb von 10 Tagen nach der Infektion. Die Mäuse wiesen dieselben Symptome wie untransplantierte Tiere auf, während Wildtyp-Tiere ohne Einschränkungen überlebten (Abb. 26 D, E).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Defekt in der Produktion neutralisierender Antikörper als Grund für den letalen Ausgang der VSV-Infektion ausgeschlossen werden kann.

3.2.9 IRF5-defiziente B-Zellen exprimieren ausreichende Mengen an TNF β

Neben der Produktion an Antikörpern, haben B-Zellen die wichtige Aufgabe, TNF β bzw. Lymphotoxin $\alpha 1\beta 2$ zu exprimieren. Dieses Zytokin ist an der Aufrechterhaltung eines spezifischen Phänotyps in Makrophagen im Sinus von Lymphknoten beteiligt. Dieser verhindert die Ausbreitung von VSV aus dem Blut oder lymphatischen Geweben in das ZNS (154). VSV kann bis zum 4. Tag nach der Infektion in der Lunge von IRF5^{-/-} Mäusen replizieren (vgl. 1.2). Im Folgenden sollte überprüft werden, ob IRF5-defiziente B-Zellen in der Lage sind, ausreichend TNF β zu produzieren, um die Ausbreitung über periphere Lymphknoten im Gehirn zu verhindern. Dazu wurden naive

B-Zellen, die den Co-Rezeptor CD19⁺ exprimieren aus IRF5^{-/-} und C57Bl/6 Splenozyten isoliert. CD19 ist sowohl bei naiven als auch malignen B-Zellen auf der Oberfläche vorhanden und somit ein verlässlicher B-Zell-Marker bei einer Vielfalt an Reifungsphasen. Nach Isolation der mRNA aus den B-Zellen wurde die Expression von TNFβ mittels RT-PCR bestimmt. Die Analyse ergab, dass die B-Zellen aus IRF5^{-/-} Tieren 3-mal mehr TNFβ exprimieren als Wildtyp-Tieren (vgl. Abb. 27). Ein veränderter Phänotyp von Makrophagen, welcher die Ausbreitung von VSV ins ZNS begünstigt, ist somit unwahrscheinlich.

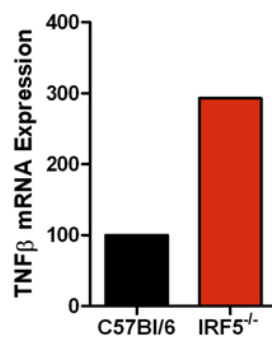


Abb. 27: B-Zellen aus IRF5^{-/-} Mäusen exprimieren mehr TNFβ-mRNA als Wildtyp-B-Zellen

CD19⁺ B-Zellen wurden aus den Splenozyten aus C57Bl/6 und IRF5^{-/-} Mäusen aussortiert und nach mRNA-Isolation mittels RT-PCR auf die Expression von TNFβ überprüft. Die Expression wurde auf die Expression von β-Aktin normalisiert.

3.2.10 Nach intracerebraler Infektion sterben IRF5^{-/-} Mäuse mit derselben Kinetik wie Wildtyp-Mäuse

Im Weiteren sollte überprüft werden, ob IRF5 einen Einfluss auf die lokale Replikation von VSV im Gehirn ausübt. Dafür wurden C57Bl/6 und IRF5^{-/-} Mäuse mit einer sehr niedrigen Dosis von 10 pfu VSV intracerebral (i.c.) infiziert und ihr Überleben über 14 Tage beobachtet. Diese Infektionsroute infiziert das Gehirn direkt und erlaubt Rückschlüsse auf die Funktion von IRF5 unabhängig vom Eintritt des Virus in das Gehirn. Beide Mausstämme zeigten eine hohe Suszeptibilität gegenüber dieser Infektion und starben innerhalb von 6 Tagen (vgl. Abb. 28).

Dies zeigt, dass IRF5 nicht ausreichend ist, um Mäuse vor einer i.c. Infektion zu schützen. Daraus lässt sich schließen, dass IRF5 für frühere Ereignisse während des Infektionsverlaufs im Gehirn verantwortlich ist.

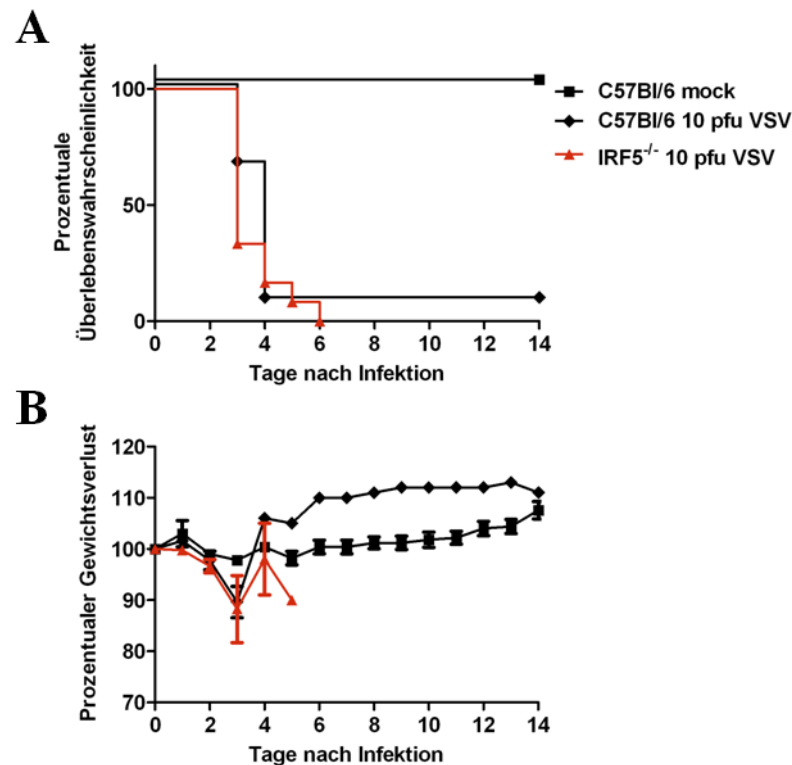


Abb. 28: IRF5 schützt Mäuse nicht einer tödlich verlaufenden intracerebralen VSV-Infektion
 C57Bl/6 (n = 12) und IRF5^{-/-} (n = 12) Mäusen wurden mit 10 pfu VSV bzw. PBS (n = 5) i.c. infiziert. A, Untersuchung der Überlebenswahrscheinlichkeit mittels Kaplan-Meier Analyse. Unterschiede der Überlebenswahrscheinlichkeit sind signifikant ($p < 0,0001$). B, Prozentuale Änderungen des mittleren Körpergewichts im Verlauf der Infektion. Das Körpergewicht wurde am Tag 0 (Tag der Infektion) rechnerisch auf 100 % gesetzt.

3.2.11 Die IRF5-Signaltransduktion wird nicht nur über TLR7 vermittelt

PAMPS sind konservierte Molekülstrukturen, die zur Aktivierung des angeborenen Immunsystems durch PRRs erkannt werden. VSV ist ein -ss RNA Virus, der unter anderem durch TLR7/9 und RIG-I erkannt wird.

Im Gegensatz zu IRF3 und IRF7 wurde publiziert, dass IRF5 in Mäusen nur durch TLR7 in einem MyD88-abhängigen Signalweg aktiviert wird und nicht in einem TLR3 oder RIG-I-vermittelten Signalweg (170). Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden TLR7^{-/-} mit 1×10^4 pfu VSV infiziert und ihr Überleben über 14 Tage beobachtet. Im Gegensatz zu den IRF5^{-/-} Mäusen, die innerhalb von 10 Tagen der Infektion starben, überlebten 60 % der TLR7-defizienten Mäuse die Infektion mit VSV symptomfrei (vgl. Abb. 29).

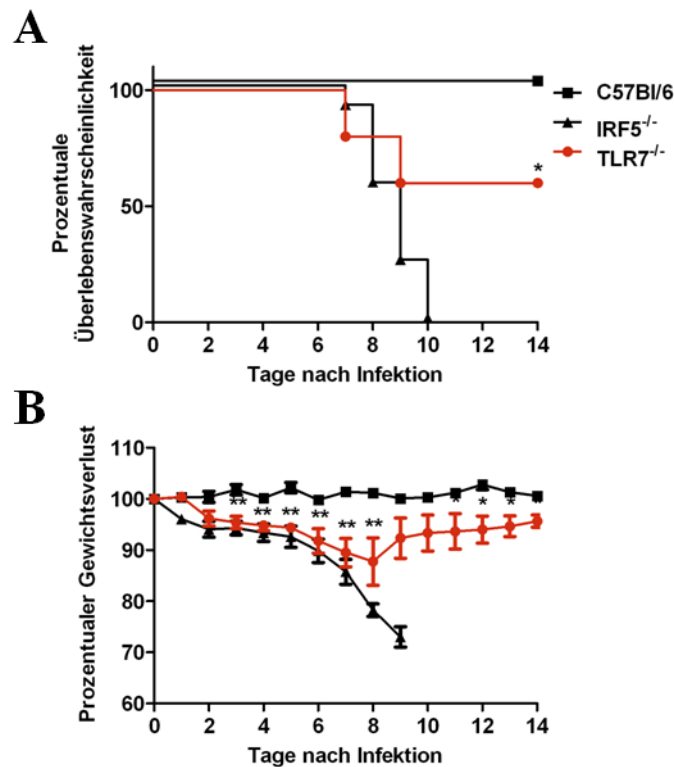


Abb. 29: TLR7 ist für die Bekämpfung einer VSV-Infektion nicht notwendig

C57Bl/6 (n = 10), IRF5^{-/-} (n = 13) und TLR7^{-/-} (n = 5) Mäusen wurden mit 1x10⁴ pfu VSV, IFNAR^{-/-} (n = 5) Mäuse mit 1x10² pfu VSV i.n. infiziert. A, Untersuchung der Überlebenswahrscheinlichkeit mittels Kaplan-Meier Analyse. Unterschiede der Überlebenswahrscheinlichkeit sind signifikant (p < 0,0001). B, Prozentuale Änderungen des mittleren Körpergewichts im Verlauf der Infektion. Das Körpergewicht wurde am Tag 0 (Tag der Infektion) rechnerisch auf 100 % gesetzt. * p ≤ 0,0474, ** p ≤ 0,006949

IRF5^{-/-} Mäuse sind nicht fähig, die Replikation von VSV im ZNS zu kontrollieren. Um zu überprüfen, ob TLR7^{-/-} Mäuse ebenso wie Wildtyp-Mäuse VSV eliminieren können, wurde ein Plaque Assay durchgeführt. Am 2. Tag nach der Infektion wurden im selben Ausmaß wie in Wildtyp-Mäusen im gesamten Gehirn von TLR7^{-/-} Mäusen virale Partikel gefunden (Abb. 30). Im Gegensatz zu IRF5^{-/-} oder C57Bl/6 Mäusen konnte VSV in der Lunge von TLR7^{-/-} Mäusen nicht replizieren. Am Tag 4 nach der Infektion blieb die Vermehrung des Virus auf den *Bulbus olfactorius* beschränkt. Am 8. Tag konnte das Virus sowohl in Wildtyp-Tieren, wie auch in TLR7^{-/-} Mäusen in keinem der untersuchten Organe mehr gefunden werden.

Wäre TLR7 der kritische Trigger des IRF5-Signalweges, wäre zu erwarten gewesen, dass die Tiere eine ähnliche Suszeptibilität zeigen wie IRF5^{-/-} Mäuse. Im Gegensatz zu IRF5^{-/-} sind TLR7^{-/-} Mäuse, ähnlich wie Wildtyp-Tiere, in der Lage eine virale Infektion

mit VSV im gesamten Organismus zu kontrollieren. Die Daten deuten darauf hin, dass IRF5 nicht ausschließlich über TLR7 aktiviert wird, sondern auch in die Signaltransduktionskette anderer PRR involviert ist.

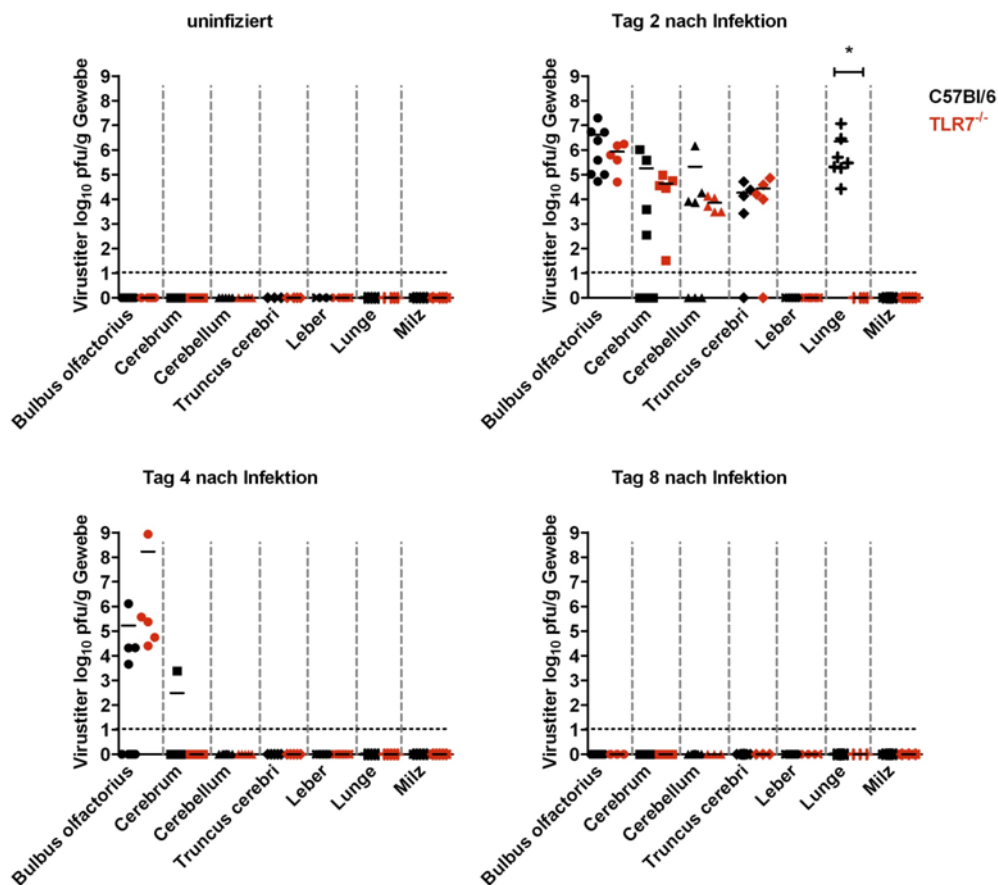


Abb. 30: TLR7^{-/-} Mäuse sind wie C57BL/6 Mäuse in der Lage VSV im gesamten Organismus zu eliminieren

C57BL/6 (n = 5-12) und TLR7^{-/-} (n = 3-5) Tiere wurden i.n. mit 10⁴ pfu VSV infiziert. An Tag 0, 2, 4 bzw. Tag 8 nach der Infektion wurden die Mäuse getötet und der Virustiter im *Bulbus olfactorius*, *Cerebrum*, *Cerebellum* und *Truncus cerebri*, Leber, Lunge und Milz mittels Plaque Assay bestimmt.

* p = 0,02537

4 Diskussion

4.1 Generierung der Rsad2-TurboFP635-Reporterm Maus

Die erste Antwort eines Organismus auf eindringende Pathogene ist die Sekretion von Zytokinen und Chemokinen. Die wichtigsten Zytokine, welche nach viralen Infektionen durch die Zellen produziert werden, sind IFN. Ziel dieser angeborenen Immunantwort ist es, durch die Induktion antiviraler Gene die Virusreplikation zu blockieren und eine weitere Ausbreitung der Viren zu verhindern. Ein Vertreter dieser Gene ist Viperin, ein hoch konserviertes Protein, welches die Vermehrung einer Vielzahl an human relevanten Viren über unterschiedliche Mechanismen inhibiert. Interessanterweise kann Viperin nach Virusinfektionen auch IFN-unabhängig über IRF1 induziert werden (98), ein Mechanismus, der für die antivirale Antwort essentiell ist, wenn Viren Mechanismen entwickelt haben, welche die Induktion und Wirkung von IFN umgehen (50). Dieser redundante Mechanismus weist auf eine essentielle Rolle Viperins bei der Wirtsabwehr hin. Um die Bedeutung von Viperin für die Bekämpfung einer viralen Infektion *in vivo* untersuchen zu können, sollte eine Viperin-Reporterm Maus generiert werden. Die Einbringung eines Reportergens unter der Kontrolle des Rsad2-Promotors sollte zusätzlich ermöglichen, die zeitliche und räumliche Regulation des Gens zu untersuchen. Dazu wurde ein Konstrukt generiert, dass ein Reportergen unter die Kontrolle des Rsad2-Promotors stellt. Das generierte Konstrukt zur homologen Rekombination in mES-Zellen war funktional und führte nach Stimulation mit Typ I IFN zur Expression des Fluoreszenzproteins (vgl. 3.1.1). Dieses Konstrukt konnte erfolgreich in mES integriert und chimäre Tiere generiert werden (vgl. 3.1.2). Durch die Verpaarungen der Chimäre mit C57Bl/6 Tieren konnten heterozygote Nachkommen gezüchtet werden (vgl. 3.1.3). Durch eine Verpaarung heterozygoter Tiere sollten mit einer Wahrscheinlichkeit von 25 % homozygote Knock-in-Tiere entstehen. Allerdings konnten keine Nachkommen identifiziert werden, welche die Modifikation auf beiden Allelen trugen. Ursächlich dafür könnte eine embryonale Letalität durch den Verlust des Rsad2-Gens sein.

Allerdings wurde ein konventioneller Knock-out, in dem das Exon 1 und Exon 2 durch eine Selektionskassette ersetzt wurden, bereits erfolgreich durchgeführt. Die Rsad2^{-/-}

Mäuse zeigten keine phänotypischen Auffälligkeiten, waren überlebensfähig und fertil (171). Der Verlust des Rsad2-Gens selbst kann also nicht ursächlich sein. Auch eine zytotoxische Aktivität des Reportergens TurboFP635 ist unwahrscheinlich, da transgene Tiere, die das Fluoreszenzgen tragen lebensfähig sind (172).

Die Analyse der chromosomalen DNA der transgenen Nachkommen der F2-Generation mittels Southern Blot zeigte allerdings, dass die Rekombinationskassette nicht in den richtigen Locus integrierte. Grund hierfür könnte die Injektion einer mit anderen Zellen kontaminierte ES-Zellpopulation bei der Blastozysteninjektion sein. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass es aufgrund der großen chromosomalen Veränderung durch Eliminierung der kompletten Intron-Exon-Struktur des Rsad2-Gens zu weiteren Rekombinationsereignissen gekommen ist.

4.2 Charakterisierung des Einflusses von IRF5 auf die antivirale Wirtsabwehr

Genomanalysen zeigten eine Assoziation zwischen verschiedenen Splicevarianten und einem Polymorphismus im Transkriptionsfaktor IRF5 und verschiedenen Autoimmunkrankheiten (64, 68, 65, 69). Die Bedeutung von IRF5 in der Pathogenese anderer Krankheiten ist allerdings nicht eindeutig geklärt. Einerseits konnte gezeigt werden, dass IRF5 nach viralen Infektionen an der Induktion von Typ I IFN und proinflammatorischen Zytokinen beteiligt ist. Diese *in vitro*-Studien wiesen darauf hin, dass IRF5 an der antiviralen Wirtsabwehr beteiligt ist (2). Andererseits, konnte in weiteren Experimenten kein Defekt in der Typ I IFN-Produktion von pDCs, den Hauptproduzenten an IFN α , aus IRF5^{-/-} Mäusen gefunden werden (1, 3). Aufgrund dieser kontroversen Datenlage sollte die Rolle von IRF5 in der angeborenen und erworbenen Immunität näher untersucht werden.

Um die Wirkung von IRF5 *in vivo* zu zeigen, wurden C57Bl/6 und IRF5^{-/-} Mäuse mit einer mittleren Dosis von 1×10^4 pfu VSV intranasal infiziert. Dabei waren IRF5^{-/-} Mäuse anfällig gegenüber der VSV-Infektion und starben nach 10 Tagen mit starken Anzeichen von Apathie und Lähmung (vgl. 3.2.1).

Untersuchungen der Virusausbreitung und -vermehrung haben gezeigt, dass VSV in der Lunge von IRF5^{-/-} gegenüber C57Bl/6 Mäusen länger replizieren kann (vgl. 3.2.2). Das

Virus wird aber nach 4 Tagen auch in IRF5^{-/-} in der Peripherie vollständig eliminiert. In den peripheren Organen wird die Virusreplikation durch IRF5 also wenig beeinflusst.

VSV ist ein neurotropisches Virus, das bevorzugt in den Zellen des ZNS repliziert (142, 143). Nach intranasaler Applikation kann VSV über die ORN innerhalb von 12-24 Stunden in die Zellen des Riechhirns gelangen und diese infizieren (145). Wildtyp-Mäuse können die Virusinfektion nach 4 Tagen kontrollieren, in IRF5^{-/-} Mäusen hingegen kommt es nicht zur Eliminierung. In den Knock-out-Tieren breitet sich das Virus über die Zeit in rostral-lateraler Richtung über das gesamte Gehirn aus und vermehrt sich schließlich in allen Hirnteilen sehr stark. Dabei werden wie auch in Wildtyp-Mäusen beschrieben nur Neurone infiziert (vgl. 3.2.3). Eine Ausdehnung des Tropismus auf Astrozyten oder Mikroglia konnte nicht beobachtet werden.

Daraus ergibt sich die Frage, welche Mechanismen IRF5 im ZNS steuert, die zur Bekämpfung des Virus beitragen.

4.2.1 Einfluss von IRF5 auf die angeborene Immunantwort

IFN stellen die initiale Abwehr gegen VSV-Infektionen dar. Mäuse ohne IFNAR, und somit ohne funktionelles Typ I IFN-System, sind im Gegensatz zu Wildtyp-Mäusen nicht in der Lage, Virusinfektionen zu kontrollieren und sterben innerhalb weniger Tage nach der Infektion mit VSV (31). Einige Arbeiten zeigen, dass IRF5 an der Induktion von IFN beteiligt ist (2, 4). Mittels ELISA wurden die IFN α -Konzentrationen im Serum bestimmt. Dabei wurde ein Maximum an IFN α 48 Stunden nach intranasaler Infektion detektiert (vgl. 3.2.4). C57BL/6 Mäuse hatten durchschnittlich 10-mal mehr IFN α im Serum als IRF5^{-/-} Tiere. Allerdings kann auch in IRF5^{-/-} Mäusen die Virusvermehrung in der Peripherie verhindert werden. Da IRF5^{-/-}-Mäuse in der Peripherie stark reduzierte IFN-Titer im Serum zeigten, ist zu vermuten, dass auch die Menge an lokal im ZNS produzierten IFN geringer ist. Bisher konnte nach i.n. Infektion kein IFN im Gehirn detektiert werden. Experimente mit Mäusen, mit einer ZNS-spezifischen Deletion des IFNAR, zeigen, dass ein intaktes IFN-System in der Peripherie nicht ausreichend ist, um Infektionen des ZNS mit VSV zu verhindern (173). Diese widersprüchlichen Daten können mit der geringen Sensitivität kommerzieller IFN-ELISAs erklärt werden. Sensitive Reportermäuse, die das

Reporter-gen Luziferase unter der Kontrolle des IFN β -Promotors exprimieren, zeigen nach i.n. VSV-Infektion eine Luziferaseexpression im Gehirn (persönliche Mitteilung Detje). Dabei ist allerdings unklar, welche Menge an IFN notwendig ist um eine adäquate Wirtsantwort zu induzieren und infizierte, wie benachbarte Zellen in einen antiviralen Status zu versetzen

Wie genau IFN die Verbreitung des Virus im ZNS hemmt ist unklar. IFN inhibiert die frühe virale Transkription und induziert ISGs mit antiviraler Wirkung. Welches IFN-induzierte Protein diese Funktion allerdings vermittelt, ist unbekannt (174). Es ist davon auszugehen, dass die VSV-Replikation *in vivo* durch mehrere ISGs gehemmt wird. Allerdings wurde für das Gen Ifit2 gezeigt, dass Knock-out-Mäuse hoch anfällig gegenüber i.n. VSV-Infektionen sind (77). In Zellkulturexperimenten konnten auch für andere ISGs wie ISG20, Mx2, Rsad2 und Usp18 ein Einfluss auf die Propagation des Virus nachgewiesen werden (148, 147, 98). Über die Expression dieser Gene können also Rückschlüsse auf den antiviralen Status der Zelle gezogen werden. Deshalb wurde die Transkription der ISGs in der Lunge und im Gehirn von IRF5^{-/-} Mäusen mittels RT-PCR analysiert (vgl. 3.2.5). In der Lunge unterscheiden sich die kinetischen Verläufe der Genexpressionen in den beiden Mausstämmen. Während in den C57Bl/6 die Expression kontinuierlich ansteigt und dann zeitgleich mit dem IFN α im Serum seinen Peak bei 48 h nach der Infektion erreicht, ist die maximale Expression in den IRF5^{-/-} Tieren bereits nach 24 h erreicht. Nach 48 h Stunden liegt die Expression der Wildtyp-Mäuse deutlich über denen der IRF5^{-/-} Mäuse. Dennoch sind Knock-out-Tiere in der Lage die VSV-Replikation in der Lunge zu kontrollieren. Dies belegt, dass die Produktion an IFN α in der Peripherie eine untergeordnete Rolle spielt. Diese Resultate spiegeln die Ergebnisse von Expressionsanalysen in embryonalen Mausfibroblasten wider. Auch hier wurden trotz der Deletion von IRF5 keine signifikanten Unterschiede in der Expression verschiedener ISGs beobachtet (165). Untersucht man die Virusreplikation in diesen Zellen, wird klar, dass VSV nicht wie in IFNAR^{-/-} Zellen uneingeschränkt replizieren kann, sondern die Vermehrungsrate trotz des Verlusts von IRF5 limitiert wird (166).

Der Expressionsverlauf der ISGs im Gehirn folgt in den IRF5^{-/-} und C57BL/6 Mäusen der gleichen Kinetik und hat seinen Höhepunkt nach 48 h. Hierbei ist hervorzuheben, dass die IRF5^{-/-} Tiere sogar tendenziell höhere Expressionen aufweisen, als die Wildtyp-

Mäuse. Dies lässt vermuten, dass, trotz der verminderten Induktion von IFN, eine antivirale IFN-Antwort in den IRF5^{-/-} Mäusen etabliert werden kann.

Interessanterweise ist die Basalexpression der ISGs im Gehirn der IRF5^{-/-} Mäuse höher als in C57Bl/6 Tieren. Dies lässt Raum für Spekulationen, dass IRF5 in Abwesenheit von IFN an der Repression von ISGs beteiligt sein könnte.

Die hier produzierten Daten deuten daraufhin, dass IRF5 *in vivo* an der Induktion von Typ I IFN beteiligt ist. Trotz reduzierter IFN-Titer im Serum sind IRF5^{-/-} Tiere in der Lage einen antiviralen Status in ihren Zellen zu etablieren. Der Mangel an produzierten IFN scheint also nicht ursächlich für die lethale VSV-Infektion zu sein.

Die hier beschriebenen *in vitro*-Experimente wurden in Fibroblasten- und Makrophagenkulturen durchgeführt. Histologische Untersuchungen zeigten, dass VSV auch in IRF5-defizienten Tieren Neurone infiziert. Da über kommerzielle Methoden der IFN-Titer nicht bestimmt werden kann, bieten sich Zellkulturexperimente mit primären Neuronen für weitere Untersuchungen an.

4.2.2 Einfluss von IRF5 auf die adaptive Immunantwort

Neben der antiviralen Wirkung kann IFN auch direkt und indirekt auf Immunzellen wirken und deren Funktion modulieren. Deshalb wurde überprüft, ob IRF5 indirekt über die Induktion von IFN oder direkt einen Einfluss auf die Komposition von Immunzellen in den Zielorganen nach einer VSV-Infektion hat. Der durch Immunzellen des adaptiven Immunsystems vermittelte antivirale Schutz ist ein langsamer Prozess, der erst nach etwa 6-10 Tagen nach der Infektion zum Tragen kommt. Der im Vergleich zu IFNAR^{-/-} Mäusen verzögerte Krankheitsverlauf in IRF5^{-/-} Mäusen könnte somit einen Hinweis auf Defekte der erworbenen Immunität geben (175, 176).

Der Einfluss von IRF5 auf die humorale Immunantwort

IRF5 beeinflusst die Entwicklung von B-Zellen. 14 Monate alte IRF5^{-/-} Mäuse entwickeln eine Splenomegalie in Folge einer Ansammlung an CD19⁺ B220⁺ B-Zellen und der damit verbundenen Zerstörung des normalen Aufbaus der Milz (74). Die in

dieser Arbeit verwendeten Tiere waren zwischen 6 und 12 Wochen alt und zeigten keinerlei phänotypisch anormale Auffälligkeiten der Milz. Die Untersuchung des Serumlevel an neutralisierenden IgM- und IgG-Antikörpern 4 und 8 Tage nach der VSV-Infektion zeigten allerdings, dass der Verlust an IRF5 zu einer verminderten Produktion an IgM-Antikörper führt (vgl. 3.2.7). Dies ist einerseits darauf zurückzuführen, dass naive IRF5^{-/-} Mäuse eine Störung in der B-Zellen-Homöostase aufweisen und folglich weniger B-Lymphozyten besitzen (vgl. 3.2.6). Des Weiteren ist aber nicht auszuschließen, dass diese auch weniger Antikörper produzieren. Außerdem resultiert die Inaktivierung von IRF5 in einem veränderten Isotypenwechsel. Während Wildtyp-Mäuse am 8. Tag nach der Infektion nur noch IgG-Antikörper produzieren, war im Serum der IRF5^{-/-} Mäuse ein geringer Titer an IgM- und IgG-Antikörpern zu messen. Dies deutet auf einen verspäteten Subklassenwechsel in den IRF5^{-/-} Mäusen nach Virusinfektionen hin. Diese Beobachtungen werden von einer kürzlich veröffentlichten Publikation gestützt. Diese zeigte, dass IRF5 die IgG2a/c-Antwort gegenüber verschiedenen T-Zell-abhängigen- und -unabhängigen Stimuli, wie auch nach einer Polyomavirus Infektion vermittelt. Dabei gelang es, Einblicke in den molekularen Mechanismus zu geben. Es wird vermutet, dass IRF5 die IgG-Antwort über die Repression von Ikaros kontrolliert (177).

Antikörper stellen eine wirkungsvolle Immunabwehr gegen verschiedene RNA-Viren, wie auch VSV dar. Dies konnte durch Experimente mit B-Zell-defizienten Mäusen untersucht werden. In Abwesenheit eines passiven Schutzes durch Antikörper waren diese susceptibler gegen VSV als nach der Gabe der Immunglobuline (153). Wie genau Antikörper VSV neutralisieren ist jedoch unklar. Viele spezifische Antikörper, deren Aufgabe der Schutz oder die Vernichtung des Virus sind, sind gegen Oberflächenproteine des Virus gerichtet und hemmen intrazellulär die Replikation des Virus (7).

Um zu überprüfen, ob der unvollständige Subklassenwechsel und die damit einhergehende verminderte Produktion an neutralisierenden Antikörpern, der Grund dafür ist, dass IRF5^{-/-} Mäuse das Virus im Gehirn nicht bekämpfen können, wurden Wildtyp B-Zellen adaptiv in IRF5^{-/-} transferiert. Durch diese Behandlung konnte eine normale Antikörperantwort generiert werden (vgl. 3.2.8). Die IRF5^{-/-} zeigten keine signifikanten Unterschiede in den IgM- und IgG-Titern. Dennoch verstarben die Tiere binnen 10 Tage.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass IRF5 eine wichtige Rolle in der Funktionalität von B-Zellen spielt. Auch wenn die eingeschränkte Antikörperproduktion als Ursache für unzureichende Virusbekämpfung im Gehirn ausgeschlossen werden kann, ist diese Beobachtung von großer Bedeutung. Mehrere Arbeiten weisen auf einen Zusammenhang veränderter IRF5-Expressionen und der Ausprägung von Autoimmunerkrankungen, wie SLE hin. Ein Kennzeichen der Erkrankung SLE ist die Aktivierung von B-Zellen und Generierung von Autoantikörper-produzierenden Plasmazellen. Durch die beschriebene Beteiligung von IRF5 an der Funktionalität von B-Zellen ist ein weiterer Schritt zum Verstehen dieser Krankheit getan.

In diesem Zusammenhang soll auch auf die Publikation von Iannacone et al. hingewiesen werden. Die Autoren beschrieben in einem VSV-Model nach intrafootpad-Injektion von Wildtyp-Mäusen, dass die Produktion von Typ I IFN, produziert von infizierten Makrophagen und pDCs im Sinus infizierter Mäuse, die Infektion peripherer Nerven und damit die Infektion des ZNS verhindert (155). Wirksam wird dieses Modell bei peripheren Infektionen der Mäuse über i.v. oder s.c. Behandlung. Da VSV noch bis zum 4. Tag nach der Infektion in der Lunge replizieren kann, stellt dies ein peripheres Reservoir an Viruspartikeln dar, die in einer zweiten Welle das ZNS infizieren können. Es wurde beschrieben, dass durch B-Zellen produziertes TNF β elementar für die Aufrechterhaltung dieser Schutzfunktion der Makrophagen ist (154). Die hier angestellten Analysen ergaben, dass die B-Zellen von IRF5^{-/-} Tieren hinreichend in der Lage sind TNF β zu produzieren, was den Eintritt von VSV über periphere Nerven in das ZNS unwahrscheinlich macht.

Der Einfluss von IRF5 auf andere Immunzellen

Naive IRF5^{-/-} Tiere zeigten eine veränderte Immunzellhomöostase. Diese zeichnet sich neben weniger B-Zellen auch durch eine geringere Anzahl an CD4⁺ T-Zellen aus (vgl. 3.2.6). Nach 8 Tagen ist das ZNS durch T-Zellen infiltriert. Im Gegensatz zu naiven T-Zellen dringen aktivierte T-Zellen regelmäßig in das ZNS ein. Finden sie dort kein Antigen vor, verlassen sie das ZNS wieder oder sterben durch Apoptose. Treffen T-Zellen aber im ZNS auf ihr Antigen, verbleiben sie dort und werden aktiviert (131). Nach intranasaler Infektion mit VSV konnten replikationsfähige Viruspartikel in allen

Hirnregionen von IRF5^{-/-} Mäusen nachgewiesen werden. Dies führt zur Ausschüttung von Zytokinen, darunter Typ I IFN durch Neurone und andere Gliazellen (136). Infizierte Neurone produzieren aber auch viele weitere Zytokine, darunter IFN γ , IL6, CX3CL1 und CCL21. CX3CL1 ist ein membrangebundenes Chemokin, welches nach neuronaler Schädigungen, wie Virusinfektionen, von der Zelloberfläche abgespalten wird. Makrophagen und Gliazellen exprimieren den CX3CL1-Rezeptor und werden über die Ligand-Rezeptor-Interaktion aktiviert. Die Analyse der Immunzellen im Gehirn ergab, dass die Anzahl an Monozyten im Gehirn durch den Verlust von IRF5 nicht verändert wird. Aufgrund der fortschreitenden Replikation des Virus findet man am 8. Tag nach der Infektion sehr viele aktivierte Makrophagen. Laut Literatur produzieren diese, je nach Art des Virus eine Vielzahl an vornehmlich proinflammatorischen Zytokinen und Chemokine, wie IL1, IL6, IL12, TNF, CCL2, CCL4, CCL5 (RANTES), CCL7 und CXCL10. Diese erhöhten Zytokinlevel können zu einer erhöhten Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke und somit zur ansteigenden Lymphozyteninfiltration führen (178). Es wurde beschrieben, dass nach Infektion mit VSV die Hochregulation der entsprechenden Rezeptoren (CCR5 und CCR2) auf T-Zellen beobachtet wurde (179). Des Weiteren werden spezifisch Adhäsionsmoleküle wie z.B. ICAM1/VCAM1 hochreguliert, die eine verstärkte Infiltration durch Lymphozyten ermöglichen (180).

VSV infiziert ausschließlich neuronale Zellen im ZNS. Es ist bekannt, dass durch T-Lymphozyten produziertes IFN γ ein wichtiger Bestandteil in der Eliminierung von VSV in Neuronen darstellt. Neben der geringeren Infiltration von T-Zellen in das Gehirn bleibt unklar, ob der Verlust an IRF5 auch einen intrinsischen Effekt auf T-Zellen ausübt, der zu einer geringeren Effektorfunktion führt.

Mittels adaptiven Transfers von T-Zellen könnte überprüft werden, ob die verminderte Infiltration einen Einfluss auf die Bekämpfung des Virus und damit das Überleben der Mäuse hat.

CD8⁺ T-Zellen sind prinzipiell über zwei Wege in der Lage, die Replikation eines Virus zu hemmen: den nicht-zytolytischen Signalweg oder den zytotoxischen Signalweg. Letzterer wird über die Effektormoleküle Perforin und Granzym, sowie der Wechselwirkung zwischen CD95-CD95L vermittelt. Es ist nicht vollständig geklärt, welche Rolle zytotoxischen T-Zellen in der Bekämpfung von VSV spielen. Prinzipiell ist der Organismus bemüht, Schädigungen langlebiger Zellen, wie Neurone mit

geringem Rehabilitationspotential zu vermeiden. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Depletion von CD8⁺ T-Zellen zu keiner Änderung des Krankheitsverlaufs nach VSV-Infektion führt und die Mäuse auch ohne zytotoxische T-Zellen sterben (173). Es wurde beschrieben, dass die Aktivität von CD8⁺ T-Zellen mit verstärkter Inflammation einhergeht. Aufgrund der verminderten Anzahl an CD8⁺ T-Zellen im Gehirn von IRF5^{-/-} Mäusen, kann vermutet werden, dass Schädigungen des Gehirns überwiegend auf die Aktivität des Virus, als auf Entzündungen im Gehirn zurückzuführen sind.

In der Anzahl von Makrophagen in der Homöostase oder nach der Infektion konnte kein Unterschied in den Knock-out-Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen gesehen werden. Jedoch ist bekannt, dass IRF5 einen Einfluss auf die Polarität von Makrophagen ausübt. Prinzipiell unterscheidet man zwei Arten an Makrophagen. Auf der einen Seite klassische M1-Makrophagen, die durch die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen zur Resistenz von Pathogenen und damit zur Gewebsschädigung beitragen. Auf der anderen Seite alternative M2-Makrophagen, die vornehmlich anti-inflammatorische Zytokine produzieren und damit an der Reparatur von Geweben und Tumorentwicklung beteiligt sind. IRF5 spielt eine entscheidende Rolle in der Differenzierung von Makrophagen. Krausgruber und Mitarbeiter zeigten, dass M1-Makrophagen durch eine hohe Expression an IRF5 gekennzeichnet sind. Folglich ist davon auszugehen, dass die Makrophagen in IRF5^{-/-} Tieren mehrheitlich den M2-Phänotyp ausprägen. Dies legt die Vermutung nahe, dass in den Gehirnen von IRF5^{-/-} Tieren weniger Entzündungsprozesse stattfinden. Des Weiteren ist es denkbar, dass die verringerte Infiltration von T-Zellen in IRF5^{-/-} Gehirnen im Vergleich zu denen aus Wildtyp-Mäusen eine logische Konsequenz der geringeren T-Zell-Anzahl in naiven Tieren ist oder auf die mangelnde Produktion pro-inflammatorischer Zytokine, also eine unzureichende Anlockung zurückzuführen ist.

4.2.3 Einfluss sekundärer Effekte durch Dock2-Mutation

Jüngst wurde gezeigt, dass die Mehrheit der IRF5-defizienten Mauspopulationen eine spontan entstandene Mutation im Dock2-Gen tragen. Aufgrund einer Duplikation in diesem Gen kommt es zu einer Leserasterverschiebung, die in einer erniedrigten

Expression resultiert (181). Dock2 ist ein spezifisch in hämatopoetischen Zellen exprimierter Rac-spezifischer GTP-Austauschfaktor (182), der für die Migration verschiedener Immunzellen eine Rolle spielt (183, 184, 185, 186, 187, 188, 189). Zusätzlich kontrolliert Dock2 die TLR7 und TLR9 abhängige IFN-Induktion über Rac Aktivierung in pDCs (190). Purtha und Kollegen zeigten nun, dass in IRF5^{-/-} x Dock2^{mu/mu} Mäusen die retrovirale Expression von Dock2, nicht jedoch von IRF5 den Defekt in der B-Zell- und pDC-Entwicklung ausgleichen kann. IRF5^{-/-} Mäuse ohne Dock2 Mutation zeigten eine weitestgehend intakte Typ I IFN Induktion und relativ normale Antikörperproduktion nach einer viralen Infektion mit WNV (181). Die in dieser Arbeit verwendeten IRF5^{-/-} Tiere zeigten bei der Untersuchung der Dock2-Expression in Splenozyten mittels RT-PCR eine um den Faktor 4 verminderte mRNA-Menge (Daten nicht gezeigt). Aufgrund des gemessenen verminderten IFN-Levels ist ein Einfluss von Dock2 auf die hier dargestellten Daten nicht ausgeschlossen. Außerdem stützen unsere Daten, die *in vitro*-Untersuchungen, in denen gezeigt wurde, dass IRF5 an der Produktion an Typ I IFN beteiligt ist. Ein Einfluss von Monozyten und damit von Dock2 ist in einem Zellkultursystem ausgeschlossen. Allerdings konnten B-Zellen und eine verminderte IFN-Produktion als alleinige Ursache für den letalen Ausgang der VSV-Infektion in IRF5^{-/-} Mäusen nach den vorangegangenen Ausführungen ausgeschlossen werden. Demzufolge sollte die Dock2-Mutation, wenn überhaupt nur geringe Auswirkungen auf die Interpretation der hier gewonnen Daten haben.

4.2.4 IRF5-vermittelte Signaltransduktion

Untersuchungen des Signaltransduktionswegs nach NDV Infektionen zeigen, dass IRF5 über TLR7/9 in einem MyD88-abhängigen Signalweg aktiviert wird, während RIG-I nur eine sehr geringe Rolle in der Aktivierung von IRF spielt (5). Gestützt wird diese Hypothese durch eine Veröffentlichung von Negishi et al., die zeigte, dass die Expression von Typ I IFN in peritonealen Makrophagen nach viralen Infektionen strikt IRF3- abhängig und IRF5-unabhängig ist (191).

Es sollte überprüft werden, ob diese Ergebnisse für VSV-Infektionen zutreffen. Dazu wurden C57Bl/6, IRF5^{-/-} und TLR7^{-/-} Tiere mit VSV infiziert und ihr Überleben 14

Tage lang beobachtet (vgl. 3.2.11). Bei einer TLR7-abhängigen Aktivierung von IRF5 wäre zu erwarten gewesen, dass IRF5^{-/-} und TLR7^{-/-} Mäuse gleich suszeptibel gegenüber der viralen Infektion sind. Während alle IRF5^{-/-} Tiere innerhalb von 10 Tagen nach der Infektion verstarben, überlebten 60 % der TLR7^{-/-} die Behandlung. Sie waren ebenso wie Wildtyp-Mäuse in der Lage das Virus innerhalb von 4 Tagen im gesamten Körper zu kontrollieren und zu eliminieren.

Die hier generierten Daten weisen darauf hin, dass IRF5 auch an der Signaltransduktion dieser PRR beteiligt sein könnte. VSV kann über die RLR RIG-I und LRRFIP1, sowie TLR7/9 und TLR13 erkannt werden, damit stellen diese PRR potenziellen Aktivator für IRF5 dar (192, 193, 9, 194, 20). Um die Bedeutung der einzelnen Rezeptoren an der IRF5-abhängigen antiviralen Wirtsabwehr zu charakterisieren, sind jedoch weitere Untersuchungen notwendig.

5 Material und Methoden

5.1 Materialien

5.1.1 Chemikalien und Enzyme

Die Chemikalien wurden von den Firmen Amersham Biosciences, Bayer, Biolabs, Bioline, Biorad, Boehringer, Difco, Flow, Fluka, Gibco, Hoechst, Invitek, Macherey-Nagel, Merck, Peqlab, Pharmacia, Promega, R&D Systems, Roche, Qiagen, Seromed, Serva, Sigma, Stratagene und USB bezogen. Alle Chemikalien wurden im höchsten Reinheitsgrad (*pro analysi*) verwendet.

Die Enzyme wurden von Amersham Biosciences, Bioline, BRL, Boehringer, Invitrogen, New England Biolabs (NEB), Pharmacia, Roche, Cell Signalling Technology und USB bezogen.

Oligonukleotidsynthesen wurden von der Firma MWG durchgeführt.

5.1.2 Virusstamm

Im Rahmen dieser Arbeit wurde Vesikuläres-Stomatitis-Virus (VSV) vom Serotyp Indiana (Mudd-Summers Isolat) verwendet. Es entstammte eigener Herstellung in BHK-Zellen.

Das verwendete Langat-Virus-Isolat war eine freundliche Gabe im Rahmen einer Kooperation mit Anna Överby, Leiterin der Abteilung Virologie, Institut klinische Mikrobiologie, Universität Umeå, Schweden.

5.1.3 Verbrauchsmittel und sonstige Materialien

Für Arbeiten in der Zellkultur wurden Materialien von folgenden Firmen verwendet: Corning, Costar, Eppendorf, Gibco, Greiner Bio-one, Nunc und Seromed.

Die verwendeten Verbrauchsmittel und sonstige Materialien wurden von folgenden Firmen bezogen: Biozym, Braun, Schott, Sarstedt, Starlabs, Eppendorf, Nunc.

5.1.4 Sterilisation

Glasmaterialien wurden für 4 h bei 180 °C im Trockenschrank sterilisiert. Sämtliche Plastikwaren, wie Eppendorfgefäße, Pipettenspitzen und Lösungen wurden für 25 min bei 121 °C autoklaviert. Lösungen, die nicht autoklaviert werden konnten, wurden durch Filter mit der Porengröße 0,22 µm sterilfiltriert.

5.1.5 Computerprogramme

Das Erstellen von Texten, Kalkulationen und Tabellen erfolgte mit den Programmen „Word 2007“ und „Excel 2007“ von Microsoft. Graphen wurden mit „GraphPad Prism“ erzeugt. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programms „R“. Southern Blots wurden mit der Software „ImageQuant“ aufgenommen. Die Bearbeitung von Bilddateien erfolgte mit „Image J“ (National Institutes of Health) und der „LSM510“ Software (Zeiss). Die Zusammenstellung von Abbildungen erfolgte mit „Powerpoint 2007“ (Microsoft).

FACS Daten wurde mittels der Programme BD „CellQuest“ und „FACS Diva“ (BD Bioscience) generiert und mit „FlowJo 7.6“ (tree star Inc.) ausgewertet.

Die Entwicklung von Klonierungsstrategien wurde mit „Vector NTI 5.0“ der Firma ATCC durchgeführt. Zum Primerdesign wurde das Programm „Primer3“ verwendet. Die Daten der Quantitative PCR (qPCR) wurden mit der „LightCycler Software Version 3.5“ von Roche analysiert.

Die Auswertung von Plaque Assays erfolgte mit Hilfe der Software „Quantity One“ (Biorad)

5.1.6 Geräte

Tabelle 4: Übersicht verwendeter Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Autoklav	6-6-6 HS1	Belimed Sauter AG
	Systec DE-65	Systec GmbH
Brutschrank	C200	Labotect
Durchflusszytometer	FACSCalibur	BD Bioscience
	Guava easyCyte	Millipore
	LSR II	BD Bioscience
Eismaschine		Ziegra
Elektroporator	Gene Pulser and Pulse Controller	BioRad
Fluoreszenzmikroskop	LSM 510 Meta	Zeiss
Gefriermikrotom	1206	Reichert-Jung
Geldokumentation	Fast Gene Blue LED Illuminator	NIPPON Genetics
Gelelektrophorese	Horizon 58	Biometra GmbH
Gewebehomogenisator	FastPrep-24	MP
Hybridisierungsöfen	Shake n stock	Hybaid
	TV30b	Memmert
Inkubatoren	C200	Labotect
Kühl- und Gefrierschränke	4 °C	Liebherr
	-20 °C	Liebherr
	-80 °C	Thermo Forma
Light Cycler	Light Cycler 480	Roche
Magnetrührer	RH IKAMAG	IKA
Mikroskope	CK2	Olympus
	Labovort	Zeitz
	Labovort FS	Zeitz
	TMS	Nikon

Material und Methoden

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Mikrotiterplatten-Photometer	Multiskan Ex	Thermo Fisher Scientific
Mikrowelle	Pro 825	Whirlpool
PCR Cycler	Thermocycler T3	Biometra
	Thermocycler TProfessional Basic Gradient	Biometra
Phosphoimaging System	Storm 860	Molecular Dynamics
Pipetten		Gilson
	Multikanalpipette Impact 1250 µl	Matrix
pH-Meter	766 Calimatic	Knick
Pipettierhilfen	Pipetboy IBS Integra	Biosciences
Schüttler	Taumelschüttler Reax3	Heiolph
	Rotationsschüttler 34528	Neolab
Spektralphotometer	NanoDrop-1000	Peqlab
Sterilbänke	HeraSafe HSP 18	Heraeus
	HeraSafe KS12	Heraeus
	HeraSafe KS15	Heraeus
	Sterilgard SG400E	Heraeus
	BDK-S 1500	BDK
Stickstofftank	17K	Harsco
Stromversorgung	Power Pac 1000	BioRad
	ST 305	Gibco
Thermoblöcke	Thermomixer compact 5350	Eppendorf
	Thermomixer compact 5355	Eppendorf
Waage	Analysewaage A120SD1	Sartorius
	Präzisionswaage IG5006	Sartorius
Wasseraufbereitungsanlage	MilliQ	Millipore
Wasserbad	Ro 3042	Rowa
	Ro 3044	Rowa
Vortexer	REAX 2000	Heidolph
Zell-Seperator	autoMACS	Miltenyi

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Zellzahlbestimmung	Zählkammer Fuchs-Rosenthal	Brand
Zentrifugen	Biofuge fesco	Heraeus
	Biofuge pico	Heraeus
	CS15R	Beckmann
	Jouan CR412	Thermo Scientific
	Megafuge 1.0 R	Heraeus
	Sigma 2-16K	Sartorius
	Sorvall RC5B Plus	Du Pont
	Sorvall RC5C	Sorvall inst

5.2 Tierexperimentelle Techniken

Alle Mausexperimente wurden entsprechend der gesetzlichen Leitlinien zur Durchführung von Tierversuchen durchgeführt und waren durch das Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit in Oldenburg (Tierversuchsnummer 070/08) genehmigt.

Alle präparativen Arbeiten wurden unter semisterilen Bedingungen durchgeführt. Um Kontaminationen mit exogenen Erregern zu vermeiden, wurden sämtliche Geräte sorgfältig gereinigt, mit 70 % Ethanol desinfiziert und autoklaviert.

5.2.1 Versuchstiere und Haltungsbedingungen

Alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten (transgenen) Mäuse wurden unter SPF-Bedingung im S1 Bereich der zentralen Tierhaltung des Helmholtz-Zentrums für Infektionsforschung generiert, gezüchtet und gehalten. C57BL/6 Mäuse wurden der eigenen Zucht entnommen oder über die Firma Harlan Laboratories bezogen. Die Genotypen wurden über PCR verifiziert (vgl. 5.3.10).

Zu Beginn eines Experiments wurden die 6-12 Wochen alten weiblichen und männlichen Tiere aus den Zuchträumen in den experimentellen Mausraum (S2)

transferiert und zur Eingewöhnung mindestens 3 Tage habituiert. In beiden Räumen werden die Mäuse in einzelbelüfteten Standardkäfigen (IVC-System Greenline, Tecniplast Deutschland GmbH) in gleichgeschlechtlichen Gruppen unter Standardbedingungen gehalten (zwölfstündiger Hell-Dunkel-Rhythmus, 15-facher Luftwechsel, Beleuchtungsstärke ca. 50 Lux, 22 °C Raumtemperatur, 55 % Luftfeuchtigkeit, Wasser und Futterpellets (Spezialdiät für Ratte/Maus Haltung, sniff GmbH) *ad libidum*, Käfigwechsel mit frischem Streu einmal pro Woche). Nur zu Zuchtzwecken wurden auch gegengeschlechtliche Gruppen gehalten.

Tabelle 5: Übersicht verwendeter Mauslinien

Genotyp	Genetischer Hintergrund	Literatur/Quelle
C57Bl/6	C57Bl/6	Harlan Laboratories
CD 45.1	C57Bl/6	195
IFNAR ^{-/-}	C57Bl/6	31
IRF5 ^{-/-}	C57Bl/6	3
Rsad2 ^{+/-mu}	C57Bl/6 x SV 129/Ola	Diese Arbeit
TLR7 ^{-/-}	C57Bl/6	196

5.2.2 Abbruchkriterien und Euthanasie

Während der Tierversuche wurden, wie im Tierschutzgesetz gefordert, strikte Abbruchkriterien eingehalten, um unnötige Schmerzen, Leiden und Schäden der Tiere zu vermeiden. Dazu wurden die Tiere täglich gewogen und auf einen guten Allgemeinzustand überprüft. Nach Auftreten von Anzeichen, die auf eine starke Belastung des Tieres hindeuten, wurde das Tier unverzüglich aus dem Versuch genommen und euthanasiert. Diese humanen Endpunkte waren: Gewichtsverlust über 20 %, struppiges, ungepflegtes Fell, geschlossene oder verklebte Augenlider, abnorme Körperhaltung, klinische Krankheitszeichen wie Diarrhoe oder Dyspnoe, Rektumprolaps, Automutilation und Bewegungsunfähigkeit.

Zur Euthanasie wurden die Mäuse mit Isofluran betäubt (vgl. 5.2.6) und anschließend durch zervikale Dislokation getötet. Zur Vermeidung von Einblutungen zur

nachfolgenden Perfusion oder Herzblutentnahme wurden die Mäuse durch Einatmung von hochkonzentriertem CO₂ euthanasiert. Hierfür wurden die Tiere in eine mit Raumluft gefüllte Tötungsbox gesetzt und das Gefäß langsam mit Gas geflutet. Sobald keine Atembewegungen der Tiere mehr sichtbar waren, wurde der Zwischenzehenreflexes überprüft und die Mäuse entblutet.

5.2.3 Adoptiver Transfer

Nach der Aufreinigung mittels magnetischen Separation (vgl. 5.5.3) wurden 5×10^6 der B-Zellen aus CD 45.1 Mäusen in 100 µl PBS intravenös in C57Bl/6 und IRF5^{-/-} Mäuse injiziert. Der erfolgreiche Transfer der Lymphozyten wurde am letzten Tag des Experiments mittels durchflusszytometrischer Analysen (vgl. 5.5.1) der Splenozyten getestet (vgl. 5.5.4). 48 h nach der Injektion wurden die Mäuse intranasal unter Vollnarkose mit 1×10^4 pfu VSV infiziert (vgl. 5.2.8) und das Überleben der Mäuse über 14 Tage beobachtet. Am 4. und 8. Tag nach der Infektion wurde den Tieren Blut entnommen (vgl. 5.2.4) um der Serumspiegel an neutralisierenden Antikörpern zu bestimmen (vgl. 5.5.6).

5.2.4 Blutentnahme

In der Regel erfolgte die Blutentnahme final über die Punktion des Herzens. Dabei wurden die Mäuse mit CO₂ getötet, der Brustkorb rasch geöffnet und das Herz unter Sichtkontrolle links, unterhalb des *Processus xiphoideus* an der Basis des Sternums in einem Winkel von 15-20° punktiert.

Wiederholte Blutentnahmen erfolgten durch Punktion des retrobulbären Venenplexus. Dabei staut man durch festen Nackengriff die Halsvenen. Mit einer Glaskapillare geht man unter Druck und leicht drehenden Bewegungen im inneren Augenwinkel in Richtung gegenüberliegendes Kiefergelenk durch die Bindehaut und punktiert den Venenplexus.

Zur Gewinnung des Serums wurde das Blut 2 h bei RT bzw. über Nacht bei 4 °C inkubiert um eine vollständige Gerinnung zu gewährleisten. Daraufhin wurde der

Blutkuchen für 20 min bei 2 000 x g abzentrifugiert und der Überstand abgenommen. Die Lagerung erfolgte je nach Anwendung bei 4 °C bis -20 °C.

5.2.5 Generierung chimärer Mäuse aus embryonalen Stammzellen

Die Herstellung von chimären Mäusen aus den manipulierten ES-Zellen wurden in der tierexperimentellen Einheit des Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung, Braunschweig von Karina Watzke durchgeführt.

5.2.6 Mausnarkose

Zur Kurzzeit-Inhalationsnarkose wurden 1-2 ml Isofluran (Albrecht) in ein Glas mit Deckel gegeben und mit etwas Zellstoff überdeckt. Die Maus wurde in das Glas gesetzt und bis zum Erlöschen des Bewusstseins beobachtet. Nach dem Herausnehmen der Mäuse blieben sie noch etwa 30 s anästhesiert.

Erforderten chirurgische, diagnostische oder therapeutische Eingriffe eine längere Bewusstlosigkeit ohne Schmerzempfindungen oder Abwehrreaktionen, wurden die Tiere mit einer intraperitoneal applizierten Injektion von 100 µl/10 g Körpergewicht einer sterilen Lösung aus 10 % Ketamin (WDT) und 5 % Rompun bzw. Xylazin (CP-Pharma) in 0,9 % NaCl anästhesiert. Das Erreichen der Narkosetiefe wurde über den Zwischenzehenreflex an der Hinterpfote überprüft.

5.2.7 Perfusion

Um für die histologische und durchflusszytometrische Analyse blutfreies Gewebe zu erhalten, wurden die Mäuse perfundiert. Dazu wurden die Tiere zunächst mit Ketamin/Rompun bzw. Xylazin anästhesiert (vgl. 5.2.6) und anschließend auf dem Präparierblock fixiert und der Thorax geöffnet. In den rechten unteren Ventrikel wird über eine Butterfly-Kanüle ein Zugang gelegt, über den PBS mittels Gravitation in die Maus geleitet und durch den verbleibenden Herzschlag in alle Organe gepumpt wurde.

In den linken Ventrikel wurde mit einer Schere in kleines Loch hinein geschnitten, über welches das Blut ablaufen konnte.

5.2.8 Virusinfektion von Mäusen

Zur intranasalen bzw. intrazerebrale Infektion wurden die Mäuse mit Ketamin/Rompun bzw. Xylazin in Vollnarkose gelegt (vgl. 5.2.6) und anschließend das in PBS verdünnte Virus in einem Gesamtvolumen von 20 µL vorsichtig in beide Nasenlöcher pipettiert bzw. mit Hilfe einer Insulinspritze und einem Abstandshalter etwa einen Millimeter tief, medial in den Hirnfrontallappen appliziert.

Bei der intraperitonealen Infektion wurde die Maus manuell in Rückenlage fixiert und 100 µl des in PBS verdünnten Virus unter Vermeidung der abdominalen Mittellinie in den linken unteren Quadranten des Abdomens injiziert.

5.3 Molekularbiologische Techniken

5.3.1 Agarose-Gelelektrophorese

5x Probenpuffer	15 % Ficoll, 50 mM EDTA, 1 x TAE, 0,05 % Bromophenolblau, 0,05 % Xylenecyanole
-----------------	--

1 x TAE-Puffer	40 mM Tris/Acetate (pH 7,5), 20 mM Natriumacetat, 1 mM EDTA
----------------	---

Die Agarose-Gelelektrophorese ist ein Verfahren zur Trennung geladener Moleküle in einem elektrischen Feld. In der vorliegenden Arbeit wurde diese Technik zur Auftrennung von unterschiedlich großen DNA-Molekülen verwendet, die aufgrund des Zucker-Phosphat-Rückgrats negativ geladen sind. Das Wanderungsverhalten der Moleküle ist dabei abhängig von deren Größe und Form, der Stärke des angelegten elektrischen Feldes sowie von der Ionenstärke, Porengröße und der Temperatur der

verwendeten Matrix. Je kleiner bzw. umso verdrillter ein DNA-Fragment ist, desto schneller wandert es in Richtung der Anode.

Der Agaroselösung wurde 2-5 μl 100 ml^{-1} Midori Green Advance zugegeben. Dieser nicht-karzinogene oder toxische Farbstoff bindet an die DNA und kann so, aufgrund seiner Fluoreszenzeigenschaften, mit Blaulicht ($\lambda = 470 \text{ nm}$) sichtbar gemacht werden.

Die Proben wurden mit 5-fach-konzentriertem Probenpuffer auf das Agarosegel aufgetragen. Dieser dient aufgrund des enthaltenen Glycerins einerseits zum Beschweren der DNA und macht andererseits den Lauf der Proben im Gel durch den Farbstoff Bromphenolblau sichtbar. Die Elektrophorese erfolgte anschließend in 1 x TAE-Puffer bei 120 V für etwa 20 min. Um später die Größe der DNA-Fragmente besser abschätzen zu können, wurden stets 2,5 μl HyperLadder I als Längenstandard mitgeführt.

5.3.2 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Nach der Auftrennung der DNA-Fragmente durch die Gelelektrophorese wurden ausgewählte Fragmente unter UV-Licht mit einem sterilen Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Anschließend erfolgte die Extraktion der DNA, entsprechend der Gebrauchsanleitung, mit dem "QIAquick Gel Extraction Kit" (Qiagen). Dazu wurden die Gelstücke mit dem Hochsalzpuffer QG versetzt und für 10 min bei 50 °C geschüttelt, bis sich die Agarose vollständig aufgelöst hatte. Die DNA-Fragmente wurden daraufhin in Anwesenheit hoher Konzentrationen chaotroper Salze an die Silikat-haltige Säulenmatrix gebunden. Nach einem Waschschriff mit dem Salz-Ethanol-Puffer PE, bei dem die DNA von RNA, verbliebenen Proteinen und anderen Verunreinigungen gereinigt wurde, konnte die DNA mit 30 μl deionisiertem Wasser wieder eluiert werden. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

Die Konzentration der DNA-Lösung wurde mit Hilfe des Spektralphotometers gemessen.

5.3.3 Präparation von BAC DNA

Die BAC-DNA wurde mit dem „NucleoBond BAC 100“ Kit (Macherey-Nagel) isoliert. Dazu wurde eine 500 ml-ÜN-Kultur von *E. coli*-Zellen bei 6 000 x g für 15 min bei 4 °C pelletiert und anschließend die BAC-DNA über eine Anionenaustauschsäule nach Angaben des Herstellers gereinigt. Die isolierte BAC-DNA wurde in 100-200 µl deionisiertem Wasser gelöst und bei 4 °C gelagert.

5.3.4 BAC recombeneering

Für die Rekombination in *E. coli* wurde das low copy Plasmid pKD46 verwendet. Es kodiert für die γ - β - und *exo*-Gene des Red-Rekombinase-System des Phagen λ unter Kontrolle des Arabinose-abhängigen Promotors P_{araBAD} (158). Unter Zugabe von Arabinose während der Anzucht der Bakterien werden die darauf kodierten Gene γ - β - und *exo* exprimiert. Außerdem ist der Replikationsursprung des pKD46 temperatursensitiv, so dass keine Replikation des Plasmids bei Temperaturen über 30 °C erfolgt.

5.3.5 Kultur und Lagerung von *E. coli*-Zellen

LB-Medium

10 g/l Bacto-Trypton, 10 g/l Hefeextrakt 5 g/l Natriumchlorid

Agarplatten

15 g Agar pro 1 l LB-Medium

Ampicillin

Stocklösung: 5 mg/ml in Ethanol, sterilfiltriert

5 µg/ml in LB-Medium; 25 mg/ml in Agarplatten

Chloramphenicol

Stocklösung: 5 mg/ml in Ethanol, sterilfiltriert

2,5 µg/ml in LB-Medium; 12,5 µg/ml in Agarplatten

Kanamycin

Stocklösung: 5 mg/ml in Wasser, sterilfiltriert

2,5 µg/ml in LB-Medium; 12,5 µg/ml in Agarplatten

Zur Kultivierung von *E. coli*-Zellen wurde die gewünschte Kolonie gepickt und in 5 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum überführt. Dieser Ansatz wurde üN bei 30 °C und 220 Upm inkubiert. Danach wurden zur Langzeit-Aufbewahrung 1 ml dieser Kultur abgenommen und mit 500 µl autoklaviertem Glycerin versetzt. Nach guter Durchmischung wurde die Zellsuspension in -80 °C eingefroren und gelagert.

5.3.6 Herstellung elektrokompetenter *E. coli*

DH10B F', mcrA, (mrr hsdRMS-mcrBC), Φ80dlacZ M15, LacX74, deoR, recA1, ara139, galU, galK, λ⁻, rpsL, endA1, nupG (Gibco BRL)

Zur Elektroporation rekombinanter DNA in den *E. coli* Bakterienstamm DH10B wurde dieser elektrokompetent gemacht. Hierzu wurden 5 ml LB-Medium mit einer gepickten Einzelkolonie angeimpft und üN bei 30 °C und 220 rpm geschüttelt. Die Übernachtskultur wurde am nächsten Morgen in 100 ml LB-Medium mit 0,1 g Arabinose überimpft und bei 30 °C und 220 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5-0,8 vermehrt. Die Zellen wurden 15 min auf Eis abgekühlt und zentrifugiert (6000 x g, 10 min, 4 °C). Der Überstand wurde dekantiert und der Zellniederschlag zweimal in 50 ml eiskaltem Wasser gewaschen und abzentrifugiert (6000 rpm, 10 min, 4 °C). Die Pellets wurden in 10 ml einer eiskalten autoklavierten 10 %igen Glycerin-Lösung (v/v) gewaschen (4000 rpm, 15 min, 4 °C). Das Pellet wurde dann in 1 ml einer eiskalten

sterilen 10%igen Glycerin-Lösung resuspendiert, zügig zu 50 µl Aliquots abgefüllt und die Eppendorf-Gefäße sofort bei -80 °C gelagert.

5.3.7 Elektroporation von DNA in elektrokompetente Bakterien

Für jeden Transformationsansatz wurden 50 µl elektrokompetenter *E. coli* DH10B Zellen 10 min auf Eis aufgetaut, mit gereinigter DNA vorsichtig gemischt und weiterhin auf Eis aufbewahrt. Die Mischung wurde in eine vorgekühlte Elektroporations-Küvette (Schichtdicke 2mm, Peqlab) überführt und die Elektroporation durchgeführt (2,5 kV, 25 µF, 200 Ω, 4-5ms). Anschließend wurde die Suspension in ein 1 ml LB-Medium versetzt und 30 min bei 37 °C und 220 rpm inkubiert. Die Suspension wurde auf LB-Platten mit den entsprechenden Antibiotika ausplattiert und bei 37 °C üN invertiert bebrütet.

5.3.8 Präparation genomischer DNA

Lysepuffer	10 mM Tris pH 7,5, 2 mM EDTA, 10 mM Natriumchlorid, 0,5 % SDS, 1 mg/ml Proteinase K
------------	--

Zur Isolierung genomischer DNA wurden die Zellen in 12- bzw. 6-Loch Platten kultiviert. Um die DNA zu präparieren, wurde das Medium entfernt und die Zellen vorsichtig mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 500 µL Lysepuffer aufgenommen, in ein Eppendorf-Gefäß überführt und üN bei 55 °C inkubiert. Durch Zugabe von 1 ml eiskaltem Ethanol mit 75 mM Natriumacetat wurde die DNA gefällt und durch Zentrifugieren (5 min, 5 000 rpm, RT) sedimentiert. Die DNA wurde zweimal mit 500 µl 70%igem Ethanol gewaschen, das Pellet getrocknet und in 50 µl deionisiertem Wasser aufgenommen und für 10 min bei 37 °C gelöst. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C.

5.3.9 Isolierung genomischer DNA aus Schwanzspitzen-Biopsien

Zur Genotypisierung der Mäuse wurde genomische DNA aus den Schwanzspitzen verwendet. Dazu wurden 0,5-1 cm lange Schwanzspitzen mit je 180 µl „DirectPCR Lysis Reagent Tail“ (Peqlab), komplettiert mit 2,7 µl Proteinase K (Qiagen), nach Herstellerangaben lysiert. Anschließend wurde für die Genotypisierungs-PCR 2 µl des Lysats pro 50 µl PCR-Reaktion einsetzen.

5.3.10 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion, auch PCR für *polymerase chain reaction*, ist eine *in vitro*-Methode zur exponentiellen Amplifikation spezifischer Nukleotidsequenzen mittels thermostabiler DNA-abhängiger DNA-Polymerasen. Ausgehend von einer einzelsträngigen Nukleinsäurematrize dienen zwei spezifische Oligonukleotide entgegengesetzter Orientierung der Polymerase als Primer. Diese hybridisieren jeweils an einen der beiden DNA-Stränge, so dass die DNA-Sequenz zwischen ihnen gezielt angereichert wird.

Standard-PCR

Das typische PCR-Programm für die Taq-DNA-Polymerase beginnt mit einer initialen Denaturierung der DNA bei 94 °C für 2 min, wobei hochmolekulare, komplexe Strukturen gelöst werden. Anschließend wird der Reaktionsansatz auf 72 °C abgekühlt. Der zyklische Teil der PCR, welcher 25-40 Mal wiederholt wird, startet mit einem Denaturierungsschritt von 94 °C für 30 s. Die DNA liegt nun für den folgenden Annealingschritt einzelsträngig vor. Die Primer hybridisieren durch Senkung der Temperatur für 30 s an die Template-DNA. Jeder Primer hat dabei eine spezifische optimale Annealingtemperatur, abhängig von der Länge und vom Guanin-Cytosin-Gehalt der Primersequenz. Danach wird die Temperatur auf 72 °C, das Temperaturoptimum der Taq-DNA-Polymerase, erhöht, wobei ein neuer zur DNA-Matrize komplementärer Strang vom 3'-Ende beginnend synthetisiert wird. Die Elongationszeit richtet sich hierbei nach der Länge des erwarteten Produkts (1 min

1 kBp⁻¹). Zur Doppelstrang-Synthese erfolgt ein finaler Elongationsschritt für 10 min bei 72 °C.

Ein Standardansatz von 50 µl beinhaltete X µl Template (50-100 ng), 25 µl 2 x PCR Master Mix, 5 µl Vorwärts-Primer (10 pmol µl⁻¹), 5 µl Rückwärts-Primer (10 pmol µl⁻¹) und wurde mit deionisiertem Wasser auf ein Endvolumen von 50 µl aufgefüllt. Zur Kontrolle der Reinheit der eingesetzten Reagenzien wurde stets ein Ansatz ohne Template als negative Kontrolle mitgeführt.

PCR mit dem Expand Long Template System

Die Fehlerhäufigkeit der Taq-DNA-Polymerase liegt bei $1,6 \times 10^{-5}$ je eingebauter Base, weshalb diese nur für Genotypisierungs-PCRs eingesetzt wurde. Zur Amplifizierung längerer Konstrukte wurde das „Expand Long Template PCR System“ verwendet. Das Prinzip ähnelt dem einer Standard-PCR. Jedoch wird hier statt der Taq-DNA-Polymerase ein Enzym-Mix aus der Taq-DNA-Polymerase und der Tgo-DNA-Polymerase eingesetzt. Letztere besitzt eine deutlich höhere Temperaturstabilität als Taq und zusätzlich eine 3'-5'-Exonuklease-Aktivität, die eine Korrekturaktivität erlaubt. Dadurch kann die Fehlerrate um den Faktor 3 gesenkt werden.

Kolonie-PCR

Zum schnellen Nachweis einer positiven Transformation eines rekombinanten Plasmids oder BACs in einen Bakterienstamm wurde eine abgewandelte Standard-PCR, Kolonie-PCR genannt, angewandt. Dabei wurden Bakterien aus einer Kolonie zunächst in ein Reaktionsgefäß mit 50 µl deionisiertem Wasser transferiert und gevortext. Zur Lyse der Zellen und Denaturierung von DNAsen wurde der Ansatz anschließend 5 min bei 99 °C gekocht. Um Zelltrümmer zu entfernen, wurden die Zellen daraufhin 1 min bei 12 000 x g zentrifugiert und 10 µl des Überstands als Template eingesetzt.

Primer

Die verwendeten Primer wurden mit Hilfe des Computerprogramms „Primer 3“ und „Vector NTI“ erstellt. Hierzu wurden die Standardeinstellungen des Programms für die Primerauswahl eingesetzt und dabei jene Primer ausgewählt, die an den Enden des zu

amplifizierenden Bereiches an den sense- bzw. antisense-Strang der DNA binden. Sollte das Amplifikat im Weiteren für eine Ligation verwendet werden, wurde in die Primer eine geeignete Restriktionsschnittstelle eingefügt. Die Oligonukleotide wurden von der Firma MWG Biotech AG bezogen.

Tabelle 6: Übersicht verwendeter Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')
Bacfor	gccacagttataagcccttacaggcagcagcaggtgtgtcctatcaccatggtgggtgaggatagcgtgctgatc
Bacrev	ggaacttctaattaaggcagtcacgtagcggctgagatgggaaggaaactccgaccagctacagggacattcacgccca
Rsad2KO P1	ataagcccttacaggcagca
Rsad2KO P2	cgggatctagccaccctaat
Rsad2KO P3	gaagctggtagccagatgt

5.3.11 Restriktion von DNA

Restriktionsenzyme werden in drei Kategorien eingeteilt. Für diese Arbeit wurden nur Restriktionsendonukleasen vom Typ II verwendet. Sie schneiden doppelsträngige DNA durch Hydrolyse der Phosphodiesterbindung innerhalb spezifischer, meist palindromischer Erkennungssequenzen. Die Methode wurde zur Klonierung von Plasmid-DNA und zur Überprüfung von Konstrukten genutzt.

Ein Restriktionsansatz von 30 µl beinhaltete X µl DNA (5-15 µg), 3 µl 10 x Restriktionspuffer, ggf. 3 µl 10 x BSA, je 1 µl Restriktionsenzym (20 U µl⁻¹) und wurde mit deionisiertem Wasser auf 30 µl aufgefüllt. Der Reaktionsansatz wurde 2 h bei 37 °C inkubiert und anschließend, wenn nötig, nach Herstellerangaben hitzeinaktiviert.

5.3.12 Isolierung von RNA

Das Arbeiten mit RNA macht es notwendig, alle verwendeten Materialien von RNAsen zu befreien. RNAsen sind Enzyme, welche RNA-Moleküle fragmentieren. Um dies zu

verhindern, wurden alle hitzebeständigen Materialien für 6 h bei 200 °C gebacken. Des Weiteren wurden nur gammasterilisierte, RNase-freie Pipettenspitzen und Reaktionsgefäße verwendet. Wasser zum Ansetzen von RNase-freien Lösungen wurde mit 0,1 % (w/v) DEPC versetzt, welches kovalent an primäre und sekundäre Amine bindet, wodurch die Aktivität der RNAsen zerstört wird.

Die Isolierung der Gesamt-RNA wurde Trizol verwendet (197). Das Prinzip der Methode beruht auf der Fällung von Proteinen und Zellwandbestandteilen durch Wasserentzug mittels des chaotropen Salzes Guanidiniumthiocyanat, der Abtrennung von DNA durch saure Phenol-Chloroform Extraktion sowie der Fällung der RNA aus der wässrigen Phase unter Zugabe von Alkohol (Verringerung der Dielektrizität) und einem monovalenten Kation (Salzbildung) in der Kälte.

100 mg Gewebe wurden in 1 ml „TRIzol Reagent“ (Invitrogen) mittels „FastPrep-24 Systems“ homogenisiert bzw. 1×10^7 Zellen in 1 ml TRIzol Reagent resuspendiert. Anschließend wurde die RNA nach Angaben des Herstellers extrahiert. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C. Die Konzentration der RNA wurde photometrisch bei 260 nm mit Hilfe des Nanodrop bestimmt.

5.3.13 Reverse Transkription (cDNA-Synthese)

Die Abkürzung cDNA steht für *complementary DNA*. Dies ist eine einzelsträngige DNA, die mit Hilfe des Enzyms reverse Transkriptase aus RNA synthetisiert wird. Die isolierte RNA wurde mit Hilfe der „First-strand reaction mix beads“ (GE Healthcare) nach den Angaben des Herstellers in cDNA umgeschrieben. Dabei wurden 5 µg RNA auf 65 °C erhitzt, um Sekundärstrukturen der RNA aufzuschmelzen, und anschließend auf Eis abgekühlt. Danach gab man den Ansatz, zusammen mit 0,5 µg OligodT Primern zu den Beads, welche bereits Puffer, Nukleotide, RNase/DNase-freies BSA und die Reverse Transkriptase enthalten, und inkubierte für 1 h bei 37 °C. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

Die erhaltene cDNA wurde anschließend 1:10 verdünnt als Template in RT-PCR-Reaktionen (vgl. 5.3.14) eingesetzt.

5.3.14 Quantitative Real-Time PCR

Tabelle 7: Übersicht verwendeter Oligonukleotide für die real-time PCR

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')
β-Aktin for	tggaatcctgtggcatccatgaaac
β-Aktin rev	taaaacgcagctcagtaacagtccg
Dock2 for	cttctccaagtctcagatgg
Dock2 rev	ttcccacagtgcgcggctca
IRF7 for	gaagaccctgatcctggtga
IRF7 rev	ccaggtccatgaggaagtgt
Ifit2 for	caccttcggtatggcaactt
Ifit2 rev	gcaaggcctcagaatcagac
ISG20 for	taagcgcctgctacacaaga
ISG20 rev	gcagcttctaaccctggatg
Mx2 for	tcaccagagtcaagtgagg
Mx2 rev	cattctccctctgccacatt
Rsad2 for	gtcctgttggtgcctgaat
Rsad2 rev	gccacgcttcagaaacatct
TNFβ for	tcgactgaaacagcagcatc
TNFβ rev	caccctcaagaggtggagac
Usp18 for	aaggaccagatcacggacac
Usp18 rev	catcctccagggttttcaga

Zur Durchführung der quantitativen Real-Time PCR wurde das „QuantiTect SYBR Green PCR Kit“ (Qiagen) verwendet. Dazu wurden 5 µl des 1:10 vorverdünnten cDNA, 10 µl SYBR Green I und je 2,5 µl Vorwärts- und Rückwärts-Primer (10 pmol µl⁻¹) gemischt. Als Negativ-Kontrolle wurde Wasser verwendet. Die Ansätze wurden anschließend im Light Cycler analysiert. Ein Light-Cycler-Lauf ähnelt dem einer herkömmlichen PCR: Er beginnt mit einer Denaturierungsphase zur Aktivierung der Taq-Polymerase bei 95 °C für 15 s, der anschließenden Amplifikation und einer

abschließenden Schmelzkurvenanalyse. Die Amplifikationsphase ist aus einer Denaturierungs- (95 °C, 15 s), Annealings- (55 °C bzw. 58 °C, 20 s) und Extensionsphase (72 °C, 30 s) unterteilt und besteht aus 45 Zyklen. Die Werte der Fluoreszenzintensität repräsentieren die Produktmenge, die in den aufeinanderfolgenden Zyklen erzeugt wird. Der Zeitpunkt bei dem die Fluoreszenz erstmals signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt, wird als Crossing Point (CP) bezeichnet und markiert den Übergang von der Basislinie in die log-linear-Phase. Hier erfolgt die Amplifikation nun mit konstanter Geschwindigkeit und somit sind Messungen mit Rückschlüssen auf die Ausgangskonzentrationen zu diesem Zeitpunkt am genauesten. Alle Daten wurden mit Hilfe des CP analysiert und gegenüber der Amplifikation des housekeeping genes β -Aktin normalisiert. Um die Spezifität eines amplifizierten Produktes bewerten zu können, wurde abschließend eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Dazu wurde nach der Amplifikationsphase die DNA nochmals bei 95 °C 5 s denaturiert, 1 min auf 70 °C abgekühlt und daraufhin aufgeschmolzen, indem die Temperatur langsam kontinuierlich von 70 °C auf 95 °C erhöht wurde. Bei einer für das Produkt spezifischen Schmelztemperatur denaturiert der Doppelstrang zu zwei einzelsträngigen Molekülen, wobei SYBR Green I freigesetzt und eine Änderung der Fluoreszenz detektiert wird. Da die doppelsträngige DNA von spezifischen DNA Fragmenten einen höheren Schmelzpunkt hat, als unspezifisch entstandene Produkte, ist so eine Unterscheidung möglich. Das Ergebnis wurde in einem Agarosegel verifiziert.

5.3.15 Southern Blot

20 x SSC	175,3g/l Natriumchlorid, 100,5g/l Tri-Natriumcitrat x 2H ₂ O, pH 7,5
Hybridisierungslösung	1 M Natriumchlorid, 50 mM Tris, pH 7,5, 10 % Dextransulfat, 1 % SDS, 250 µg/ml sonifizierte Heringssperma-DNA

Das als Southern Blot bezeichnete Verfahren dient dem Nachweis einer Gensequenz in einem komplexen DNA-Gemisch. Dazu wird die im Agarosegel aufgetrennte DNA auf

eine Nylonmembran transferiert. Durch Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten DNA-Probe können spezifische Fragmente identifiziert werden.

Hierzu wurden 10 µg der, mit einem geeigneten Restriktionsenzym fragmentierten, genomischen DNA (vgl. 5.3.8) in einem 0,8%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel für 30 min unter Schütteln in 0,4 M NaOH denaturiert. Der Transfer der DNA auf die Nylonmembran (Hybond-XL, Amershan) erfolgte in 0,4 M NaOH über einen Zeitraum von 6-16 h aufgrund von Kapillarkräften. Nach dem Transfer wurde die Nylonmembran 5 x 5 min in 2 x SSC-Lösung gewaschen und 2 h bei 80 °C getrocknet.

Radioaktive Markierung doppelsträngiger DNA

TurboFP635 Sonde 668 Bp Fragment (MscI/NcoI) des Plasmids
pCMVTurboFP_FRT3pAPGKntpII

Die zu markierende DNA wurde mit Restriktionsenzymen aus Plasmiden herausgeschnitten. Die radioaktive Markierung der DNA Sonden erfolgte mit dem „Rediprime II DNA Labelling System“ (GE Healthcare) nach den Angaben des Herstellers. Nicht inkorporierte Nukleotide wurden über eine „illustra MicroSpin G-50 Column“ (GE Healthcare) abgetrennt. Die Sonde wurde vor ihrem Einsatz 5 min aufgekocht, auf Eis abgekühlt und zu 20 ml der Hybridisierungslösung gegeben.

Hybridisierung radioaktiv markierter DNA-Sonden mit filtergebundener DNA

Die Nylonmembran wurde in einer Hybridisierungsröhre ca. 1 h mit 20 ml Hybridisierungslösung bei 65 °C in einem Ofen prähybridisiert. Anschließend wurde die denaturierte radioaktive Sonde in das Hybridisierungsgefäß gegeben. Die Hybridisierung erfolgte üN bei 65 °C. Am folgenden Tag wurde die radioaktive Probe abgegossen und die Membran 30 min in 2 x SSC mit 0,1 % SDS bei 65 °C gewaschen. Die Membran wurde nach dem Waschen in Frischhaltefolie eingepackt und zusammen mit einem Röntgenfilm in einer lichtundurchlässigen Kassette fixiert. Die Exposition

erfolgte bei RT, wobei die Dauer der Exposition von der Intensität der Strahlung abhing und von 1-3 Tagen variieren konnte.

Herstellung eines radioaktiv markierten DNA-Marker

Um die Größe eines DNA-Fragments im Southern Blot abschätzen zu können, wurde ^{35}S markierte λ DNA eingesetzt. Zur Markierung wurden 5 μg der λ -DNA mit EcoRI und HindIII geschnittene, mit 10 μl 10 x dNTP-Mix (je 25 mM dCTP, dGTP und dTTP), 5 μl α - ^{35}S -dATP (>1000 Ci/mmol; Hartmann Analytic), 2 μl 10 x Reaktionspufer und 2 U Klenow Klenow Fragment (3' \rightarrow 5' exo⁻; NEB) in einem Endvolumen von 20 μl gemischt. Die Probe wurde 30 min bei 37 °C inkubiert und bei 75 °C für 20 min hitzeinaktiviert. Die markierte DNA wurde über eine „illustra MicroSpin G-50 Column“ gereinigt und bei -20 °C.

5.4 Zellkulturtechniken

5.4.1 Kultivierung von Zellen

Tabelle 8: Übersicht verwendeter Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung	Herkunft
IB10	Embryonale Stammzellen der Stammzelllinie E14 gewonnen aus 129/Ola Mausblastozysten (160; 198)	<i>Mus musculus</i>
BHK	Embryonale Nierenzellen	<i>Mesocricetus auratus</i>
LMTK ⁻	Fibroblasten	<i>Mus musculus</i>
NIH3T3	Embryonale Fibroblasten	<i>Mus musculus</i>
Vero	Nierenzellen	<i>Chlorocebus aethiops</i>

DMEM (Dulbecco's Modifizierte Medien)

13,63 g/l DMEM Puder (Sigma), 3,67 g/l (44 mM) Natriumhydrogencarbonat, 2,6 g/l 10 mM HEPES, pH 7,2

100 x Pen/Strep

6,06 mg/ml Ampicillin (10 000 U/ml), 10 mg/ml Streptomycin, pH 7,4; gelagert bei -20 °C

100 x Glutamine

29,23 mg/ml Glutamine, sterilfiltriert; gelagert bei -20 °C

G418

100 mg/ml G418 in deionisiertem Wasser, sterilfiltriert; gelagert bei -20 °C

DMEM für NIH3T3 und Vero

DMEM, 1 x Pen/Strep, 1 x Glutamine, 10 % FCS (Lonza)

DMEM für mES

DMEM GlutaMAX (Gibco), 1x Pen/Strep, 10 % FCS (Biochrom, hitzeinaktiviert, bei 56 °C für 30 min), 1 x Na Pyruvat (Gibco), 1 x Nicht Essentielle Aminosäuren (Gibco), 0,5 mM 2- Mercaptoethanol, 0,1 % (v/v) LIF (Leukemia Inhibitory Factor, AG Dagmar wirth, HZI)

PBS

140 mM NaCl, 27 mM KCl, 7.2 mM Na₂HPO₄, 14.7mM KH₂PO₄, pH 6.8-7.0

TEP (Trypsin EDTA)

6 mM EDTA, 0.1 % Trypsin (Gibco) in PBS

Die Arbeiten mit Zellkulturen wurden unter einer sterilen Werkbank mit vertikaler Luftströmung durchgeführt. Die Arbeitsfläche und die benutzten Geräte wurden vor und nach dem Arbeiten mit 70%igen Ethanol desinfiziert. Es wurden neben Einwegverbrauchsmaterialien nur autoklavierte oder steril filtrierte Lösungen oder

Medien verwendet. Vor dem Beginn der Arbeit wurden alle Lösungen und Medien auf 37 °C vorgewärmt. Feeder-Zellen (MEFs), NIH3T3 und Vero-Zellen wurden bei 37 °C mit 5 % CO₂ und 95 % relativer Luftfeuchte kultiviert. Embryonale Stammzellen wurden bei 37 °C mit 5 % CO₂, 2 % O₂ und 95 % relativer Luftfeuchte gehalten.

5.4.2 Lagerung von Zellen

Die Zellen werden für die Lagerung im Stickstoff in FCS/10 % DMSO eingefroren. DMSO diffundiert durch die Zellmembran und ersetzt das Wasser innerhalb der Zelle. So wird verhindert, dass sich Eiskristalle beim Einfriervorgang bilden können, welche die Zellstruktur zerstören würden. Zum Einfrieren wurde das Medium abgesaugt und die Zellen in PBS gewaschen, danach wurden diese trypsinisiert, in Medium resuspendiert und anschließend für 5 min bei 200 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in dem Einfriermedium resuspendiert und im entsprechenden Volumen in einem CoolCell (Biozym) bei -80 °C eingefroren. Nach 24 h wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff gelagert.

5.4.3 Auftauen von Zellen

Bevor die in Medium mit 10 % DMSO eingefrorenen Zellen wieder in Kultur genommen werden können, muss zunächst das DMSO aus dem Medium entfernt werden. Hierfür wurden die Zellen mit 5 ml Medium in ein Zentrifugenröhrchen aufgenommen und für 3 min bei 200 x g zentrifugiert. Nachdem der Überstand verworfen wurde, werden die Zellen in Medium resuspendiert und in eine Zellkulturflasche überführt.

5.4.4 Passagieren von Zellen

Wenn die Zellen in der Zellkulturflasche eine Konfluenz von etwa 90 % erreicht haben, sollten sie passagiert werden. Die Zellen wurden zunächst in PBS gewaschen. Dies dient dazu, Calciumionen, die sich im Medium befinden, zu entfernen, da diese bei

Zugabe von Trypsin Komplexbildungen vollziehen, wodurch sich die Zellen nicht von der Zellkulturflasche lösen können. Nach dem Entfernen der Calciumionen wurden die Zellen mit ca. 5 ml TEP vom Boden gelöst, die Reaktion mit Medium gestoppt und die Zellen in einem entsprechenden Verhältnis in eine neue Zellkulturflasche mit vorgelegtem Medium überführt.

Embryonale Stammzellen von Mäusen sind pluripotente Zellen. Sie können aus Blastozysten gewonnen und dann in permanente Zellkultur überführt werden. Um dabei den undifferenzierten Zustand der ES-Zellen aufrechtzuerhalten und ihnen die Möglichkeit zu geben, in alle drei Keimblätter zu differenzieren, wurden die embryonalen Stammzellen auf irradierte Maus-Fibroblasten (Feederzellen) in LIF-haltigen Medium kultiviert. Alle 48 h wurden die Zellen passagiert und nach weiteren 24 h das Medium gewechselt.

5.4.5 Stabile Transfektion der mES-Zellen

Für die Durchführung einer Transfektion wurden zunächst 5×10^5 Zellen pro Well in einer gelatinisierten 6- well Kulturplatte ausgesät. Dazu wurden 2 ml sterile 0,1%ige (w/v) Gelatine (Sigma) in das Zellkulturgefäß gegeben und für 2 h im Inkubator inkubiert. Vor der weiteren Verwendung wurde die überstehende Gelatine entfernt. Am nächsten Morgen erfolgte ein Mediumwechsel. Die Transfektion wurde unter Verwendung von Lipofectamine 2000 (Invitrogen) entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt. Nach 6 Stunden wurde das Transfektionsgemisch durch frisches Medium ersetzt.

5.4.6 Selektion der neomycinresistenten ES-Zellklone

Die Neomycin-Selektion der ES-Zellen begann am Tag 2 nach der Transfektion. Dazu wurden die Zellen mit PBS gewaschen und Selektionsmedium (0,4 mg/ml G418 in mES-Medium) zugegeben. Das Selektionsmedium wurde jeden Tag durch frisches Medium ersetzt. Nach vier Tagen begannen die ES-Klone, die das Neomycin-

Resistenzgen nicht stabil in das Genom integriert hatten, abzusterben. Die Selektion dauerte bis Tag 10.

5.4.7 Isolierung von ES-Zellklonen

Am Tag 10 nach der Transfektion und G418 Selektion wurden die einzelnen neomycinresistenten ES-Zellen, die während dieser Zeit große Kolonien gebildet hatten einzeln isoliert und auf die neue Platte verteilt. Die einzelnen Kolonien sollten scharf begrenzt, aber nicht flach sein. Die 10 cm Zellkulturschale mit den Klonen wurde nach zweimaligem Waschen mit 10 ml PBS überschichtet. Die Kolonien wurden mit einer 200 µl-Pipette unter dem Mikroskop isoliert, in 25 µl kaltes TEP pro Vertiefung einer 96-well Platte überführt und im Inkubator 3 bis 5 min lösen lassen. Durch Zugabe von 50 µl warmen ES-Medium wurde die Trypsinierung gestoppt und die Zellen durch pipetieren vereinzelt. Die Zellsuspension wurde auf eine 96-well Platten mit 100 µl ES-Medium überführt. Das Selektionsmedium wurde nach 24 h gewechselt und die Zellen expandiert.

5.4.8 IFN β -Stimulation von Zellen

Die Behandlung von Zellen mit IFN β erfolgte mit selbstproduzierten rekombinanten murinen IFN β aus stabil transfizierten BHK-Zellen. IFN-Titer wurden durch einen antiviralen Assay mit LMTK⁻ Zellen oder durch einen Bioassay mit NIH3T3 Zellen, die stabil einen Mx2-gesteuerten Luziferase-Reporter exprimieren, bestimmt (199, 200). Eichkurven wurden mit kommerziell verfügbaren IFN β erstellt.

Zur Stimulation wurde das IFN β direkt mit dem Kulturmedium gemischt.

5.4.9 Zellzahlbestimmung

Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer oder des „Guava easyCyte“ nach Herstellerangaben ermittelt.

5.5 Immunologische und virologische Techniken

5.5.1 Durchflusszytometrie und Zellsortierung

FACS-Puffer PBS, 2 % FCS

Tabelle 9: Übersicht verwendeter Antikörper für Durchflusszytometrie und Zellsortierung.

Die Fluorochrom-konjugierte Antikörper wurden wie angegeben in FACS-Puffer verdünnt und für die Färbung verwendet.

Spezifität	Bezeichnung	Verdünnung	Hersteller
anti-B220	APC-Cy7 anti-mouse B220	1:150	ebioscience
anti-CD3	FITC anti-mouse CD3	1:300	BD Pharmingen
anti-CD4	APC anti-mouse CD4	1:300	BD Pharmingen
anti-CD8	PE anti-mouse CD8	1:800	ebioscience
	APC-Cy7 anti-mouse CD8	1:300	ebioscience
	PerCPCy5.5 anti-mouse CD8	1:400	ebioscience
anti-CD11c	PeCy7 anti-mouse CD11c	1:200	ebioscience
anti-CD16/CD32 (Fc Block)	anti- CD16/CD32	1:500	Dr. Siegfried Weiß, AG Molekulare Immunologie
anti-CD19	APC anti-mouse CD19	1:1200	ebioscience
anti-CD 45.1	APC anti-mouse CD45.1	1:500	ebioscience

Der Begriff Durchflusszytometrie beschreibt ein Messverfahren zur quantitativen Bestimmung von Zellen hinsichtlich der Expression von Oberflächenmolekülen, intrazellulären Proteinen, Peptiden oder DNA. Grundlage einer FACS-Analyse (Fluorescence Activated Cell Sorting) ist eine gefärbte Zellsuspension; die darin enthaltenen Zellen passieren einzeln einen fokussierten Laserstrahl und das dabei erzeugte Streu- und Fluoreszenzlicht wird separat detektiert. Die Quantität des gestreuten Lichts ist dabei abhängig von Volumen und Komplexität der Zelle. Die Vorwärts-Lichtstreuung ist ein Maß für die Beugung des Lichts im flachen Winkel und korreliert mit der Größe der Zellen. Die seitliche Lichtstreuung ist ein Maß für die

Brechung des Lichts im 90°-Winkel, die von der Granularität bzw. dem Plasma/Kern-Verhältnis der Zelle beeinflusst wird. Es lassen sich so Granulozyten (großes Volumen, hohe Plasma/Kern-Relation, Granula) von Lymphozyten (geringes Volumen, hoher Kernanteil) und Monozyten (intermediäres Verhalten) unterscheiden. Zur Färbung der Zellen werden meist Fluoreszenzfarbstoff-markierte Antikörper eingesetzt, die spezifisch Strukturen auf den Zellen erkennen und markieren.

Für die FACS-Färbung wurden 5×10^5 Zellen in einer 96-Loch-Platte mit V-Boden überführt und zweimal mit FACS-Puffer gewaschen. Zur Vermeidung unspezifischer Bindungen wurden die Zellen 20 min bei RT im Dunkeln in 100 µl Fc Block inkubiert. Nach Zentrifugation (10 min, 250 x g, 4 °C) wurde der Überstand verworfen und die Zellen mit 100 µl Antikörper für 30 min bei 4 °C im Dunkel inkubiert. Die Zellen wurden anschließend zweimal mit FACS-Puffer gewaschen (10 min, 250 x g, 4 °C), in 500 µl FACS-Puffer resuspendiert und mit dem FACSCalibur oder LSRII analysiert bzw. mit dem FACS Aria sortiert. Die absolute Anzahl von Zellen wurden über „TruCount Beads“ (BD Bioscience) nach Angaben des Herstellers bestimmt.

War eine direkte Analyse nicht möglich, wurden die gefärbten Zellen mit dem „Cytofix/Cytoperm Fixation/Permeabilization Solution Kit“ (BD Bioscience) nach Angaben des Herstellers fixiert.

5.5.2 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

ELISA bezeichnet ein antikörperbasiertes Nachweisverfahren zum qualitativen und quantitativen Nachweis von Proteinen in Zellkulturüberständen, Seren oder Gewebekomogenaten, basierend auf einer enzymatischen Farbreaktion. Die Proteinkonzentration kann so anhand des Substratumsatzes bestimmt werden.

Zur Bestimmung der Konzentration an IFN α im Serum der Mäuse wurde das „VeriKine Mouse IFN alpha ELISA Kit“ (Pestka Biomedical Laboratories) nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Proben wurden dazu 1:5 in Probenpuffer verdünnt. Da manche Serumkomponenten das Ergebnis des Tests verfälschen können, wurde der IFN Standard in einer Probenmatrix aus 1:5 in Probenpuffer verdünnten Serum aus naiven IFNAR^{-/-} Mäusen benutzt.

5.5.3 Isolierung von B-Zellen

Isolierungs-Puffer: PBS, 2 mM EDTA, 0,5 % (w/v) BSA, pH 7,2

Die Splenozyten wurden wie unter 5.5.4 beschrieben aus den Mäusen isoliert. Anschließend, erfolgte die Aufreinigung naiver B-Lymphozyten mittels negativer Selektion von CD43 exprimierenden Zellen unter Verwendung des „B Cell Isolation Kit“ (Miltenyi Biotec GmbH) sowie dem autoMACS (Miltenyi Biotec GmbH). Zunächst wurde die Anzahl der isolierten Milzzellen bestimmt und anschließend in der entsprechenden Menge Isolierungs-Puffer (40 µl pro 10^7 Zellen) aufgenommen, resuspendiert und gevortext. Daraufhin erfolgte die Isolation nach den Angaben des Herstellers. Die markierten Zellen wurden in Isolations-Puffer aufgenommen und die Separation der B-Zellen erfolgte mit Hilfe des autoMACS und dem Programm „Depletes“. Die erhaltenen B-Zellen wurden 10 min bei 1200 rpm zentrifugiert und in PBS aufgenommen.

5.5.4 Isolation primärer Immunzellen aus der Maus

Erythrozyten-Lysepuffer: 0,15 M NH_4Cl , 10 mM KHCO_3 , 0,1 mM Na_2EDTA , pH 7,2-7,4, sterilfiltriert

FACS-Puffer: PBS, 2 % FCS

Gehirn-Verdaulösung: PBS, 500 µg/ml Collagenase, 0,1 µg/ml TLCK, 10 µg/ml DNase I, 10 mM Hepes

Lungen-Verdaulösung: PBS, 0,2 mg/ml Collagenase/Dispase, 20 µg/ml DNase I

Die Mäuse wurden zunächst in CO_2 -gesättigter Atmosphäre getötet, in 70%igem Alkohol desinfiziert und anschließend präpariert. Die Tiere wurden mit PBS perfundiert und die Lunge, die Milz und das Gehirn wurden als ganze Organe entnommen. Sollten die Zellen anschließend für *in vivo*-Versuchen verwendet werden, erfolgten sämtliche Arbeiten unter sterilen Bedingungen, um Kontaminationen mit Bakterien zu verhindern.

Isolierung von Zellen aus dem Gehirn (modifiziert nach 201)

Für die Isolation von Lymphozyten aus dem Gehirn wurden die Organe mit Hilfe eines Spritzenstempels durch ein Zellsieb (70 μm) gedrückt, in 5 ml Gehirn-Verdauungslösung resuspendiert und 1 h bei RT unter wiederholtem Schütteln inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von PBS/2mM EDTA gestoppt und die Zellen 10 min mit 250 x g bei RT zentrifugiert. Daraufhin wurden die Zellen einmal mit FACS-Puffer gewaschen. Danach wurden die Zellen in 7 ml 40 % (v/v) Percoll-Lösung (Easycoll, Biochrome) resuspendiert, mit 1 ml 70 % (v/v) Percoll-Lösung unterschichtet und 20 min bei 2000 x g bei RT ohne Bremse zentrifugiert. Die Interphase wurde entnommen und zweimal mit FACS-Puffer gewaschen (10 min, 250 x g, 4 °C).

Isolierung von Zellen aus der Lunge

Nach Entnahme der Lungen wurden diese mit einer Schere zerkleinert, in 3 ml Lungen-Verdauungslösung für 30 min bei 37 °C im Rotationsschüttler inkubiert und anschließend der Überstand in ein Reaktionsgefäß mit PBS/5mM EDTA überführt. Die Lungenstücke wurden in 2 ml frischer Lungen-Verdauungslösung für weitere 30 min inkubiert und daraufhin mit einem Spritzenstempel durch ein Zellsieb gedrückt und mit PBS/5mM EDTA gespült. Die Zellsuspension wurde 10 min bei 250 x g und 4 °C zentrifugiert. Die Zellen wurden dann in 2 ml Erythrozyten-Lysepuffer resuspendiert, 2 min bei RT inkubiert, mit PBS/2mM EDTA gestoppt, zentrifugiert (10 min, 250 x g, 4 °C) und anschließend das Zellpellet für Durchflusszytometrische Analysen in FACS-Puffer aufgenommen.

Isolierung von Zellen aus der Milz

Während der gesamten Präparation und der späteren Analyse wurden die Zellen auf Eis kühl gehalten. Um die lymphatischen Zellen aus dem Gewebeverbund zu lösen, wurden die Milzen mit einem Spritzenstempels durch ein Zellsieb (40 μm) gedrückt und mit PBS/2mM EDTA gespült. Zur Lyse der Erythrozyten wurden die Zellen zunächst für

10 min bei 250 x g und 4 °C zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen in 2 ml Erythrozyten-Lysepuffer aufgenommen. Die Lyse wurde nach 2 min mit PBS/2mM EDTA gestoppt und die Zellen nach erneuter Zentrifugation für Durchflusszytometrische Analysen in FACS-Puffer (vgl. 5.5.1) oder zur magnetischen Separation in Isolations-Puffer (vgl. 5.5.3) aufgenommen.

5.5.5 Bestimmung von Virustitern

Kristallviolett-Lösung: 1 % Kristallviolett, 3,6 % Formaldehyd, 1 % Methanol, 20 % Ethanol

Zum Nachweis und zur Quantifizierung von infektiösen Viruspartikeln wurde ein Plaque Assay durchgeführt. Aufgrund des zytopathischen Effekts kommt es nach Infektion von Zellen mit VSV-Viruspartikeln zur Lyse der Zellen und deren unmittelbaren Nachbarzellen. So entsteht ein Loch im Zellrasen, in dem die Zellen lysiert sind und den man als Plaque bezeichnet.

Hierzu wurde der virushaltige Zellüberstand der Zellen gesammelt bzw. die Gewebe in 1 ml PBS/0,1 % BSA mit Hilfe des FastPrep-24 Systems homogenisiert. Die Virussuspension wurde in seriellen 10-fach Schritten verdünnt, vorsichtig auf einen konfluenten Vero Monolayer überschichtet und bei 37 °C 1-2 h inkubiert. Nach Abnahme der Infektionslösung wurden die Zellen mit einer 1:1 Mischung von 2 x DMEM mit 10 % FCS/2 % (w/v) Methylcellulose (high viscosity) überschichtet, um die Infektion auf die angrenzenden Nachbarzellen zu beschränken und eine Ausbreitung des Virus über das Kulturmedium zu verhindern. Die Zellen wurden daraufhin für weitere 48 h kultiviert und anschließend mit Kristallviolett fixiert und gefärbt.

Der Virustiter wurde durch Auszählen der Plaques ermittelt.

5.5.6 VSV-Neutralisationstest

Der Neutralisationstest ist eine Variante des Plaque Assays mit dem neutralisierende Antikörper gegen bestimmte Viren im Blutserum nachgewiesen werden können. Durch

Bindung von Antikörpern an die Oberfläche des Virus wird seine Aufnahme in die Zelle verhindert, so dass es zu keiner Vermehrung mehr kommen kann und die Anzahl an Plaques in einer Zellkultur reduziert wird.

Zum unabhängigen Nachweis von IgG wurden vorhandene IgM-Moleküle durch Reduktion mit 2-Mercaptoethanol zerstört. Hierzu wurde das Serum zu gleichen Teilen mit 280 mM 2-Mercaptoethanol bei Raumtemperatur vorinkubiert. Die vorbehandelten und nicht vorbehandelten Seren wurden mit serumfreien DMEM-Medium 1:20 bzw. 1:40 vorverdünnt und für 30 min bei 56 °C inkubiert. Dabei wurden die Bausteine des Komplementsystems hitzeinaktiviert. Daraufhin wurden die vorverdünnten Seren in einer seriellen 1:2 Verdünnungsreihe verdünnt und mit einer VSV-Lösung mit einer Konzentration von 5×10^2 pfu/ml vermischt und für 90 min bei 37 °C inkubiert. Die Serum-Virus-Mischung wurde auf konfluente Verozellen überführt. Nach einer 60 minütigen Inkubation bei 37 °C wurde das Medium mit 1%iger Methylcellulose überschichtet und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Am übernächsten Tag wurde das Medium entfernt und die Zellen mit Kristallviolett überschichtet.

Die jeweils nächsthöhere Serumverdünnung nach jener, bei der die Plaqueanzahl halbiert wurde, gibt den Antikörpertiter an (167).

5.6 Histologische Techniken

Tabelle 10: Übersicht verwendeter Antikörper für Histologie

Die Antikörper wurden, wie angegeben in PBS verdünnt und für die immunhistologischen Färbungen verwendet.

Primäre Antikörper

Spezifität	Bezeichnung	Wirt	Verdünnung (Inkubation)	Hersteller
Astrozyten	Anti-GFAP	rabbit	1:400 (4 h, RT)	Synaptic Systems
Mikroglia	Anti-IBA1/AIF1	rabbit	1:200 (üN, 4 °C)	Synaptic Systems
Neurone	Anti-NeuN, clone A60	mouse	1:500 (4 h, RT)	Millipore

Sekundäre Antikörper

Spezifität	Bezeichnung	Wirt	Verdünnung (Inkubation)	Hersteller
Anti-Rabbit	Alexa Fluor 647	Goat Anti-Rabbit	1:800 (2 h, RT)	Jackson ImmunoResearch
Anti-Mouse	Cy3	Goat Anti-Mouse	1:800 (2 h, RT)	Jackson ImmunoResearch

Zur Durchführung von histologischen Analysen wurden die Mäuse wie unter 5.2.7 beschrieben mit 50 ml PBS und anschließend 50 ml Roti-Histofix 4 % perfundiert. Danach wurden das Gehirn als ganzes Organ entnommen und in Roti-Histofix 4 % bei RT fixiert. Vor dem Schneiden wurde das Organ 48 h bei 4 °C in 30%iger Saccharoselösung inkubiert. Daraufhin wurden die Hemisphären getrennt und mit einem Kryotom bei -20 °C 40 µm dicke sagittale Schnitte angefertigt.

Die Schnitte wurden 3-mal 5 min mit PBS gewaschen und anschließend wie in Tabelle 10 angegeben mit dem primären Antikörper als schwimmende Schnitte gefärbt. Nachdem die Schnitte 3-mal 5 min mit PBS gewaschen wurden, erfolgt die Färbung mit dem sekundären Antikörper. Daraufhin wurden die Schnitte in AquaPolyMount (Sigma) auf einen Objektträger aufgezogen und dunkel gelagert.

5.7 Statistische Auswertung

Die Ergebnisse in dieser Arbeit sind als Mittelwerte (\pm Standardfehler (SEM)) angegeben. Die Daten stammen stets aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten. Da biologische Phänomene selten der Gauß'schen Normalverteilung folgen, erfolgte die statistische Auswertung durch den nichtparametrischen Mann-Whitney-Wilcoxon-Test. Dieser Test erlaubt es, zwei unabhängige Datengruppen bei einer nicht normalverteilten Grundgesamtheit miteinander zu vergleichen. Eine Signifikanz liegt vor, wenn der p-Wert $\leq 0,05$ ist (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$). In Überlebensexperimenten wurden die Überlebenskurven nach Kaplan-Meier mit dem nicht parametrischen Log-Rang Mantel-Cox Test auf signifikante Unterschiede untersucht.

6 Literaturverzeichnis

1. Cella, M. *et al.*, Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. *Nat Med* **5** (8), 919-923 (1999).
2. Barnes, B. J., Moore, P. A. & Pitha, P. M., Virus-specific activation of a novel interferon regulatory factor, IRF-5, results in the induction of distinct interferon alpha genes. *J Biol Chem* **276** (26), 23382-23390 (2001).
3. Takaoka, A. *et al.*, Integral role of IRF-5 in the gene induction programme activated by Toll-like receptors. *Nature* **434** (7030), 243-249 (2005).
4. Yanai, H. *et al.*, Role of IFN regulatory factor 5 transcription factor in antiviral immunity and tumor suppression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104** (9), 3402-3407 (2007).
5. Paun, A. *et al.*, Functional characterization of murine interferon regulatory factor 5 (IRF-5) and its role in the innate antiviral response. *J Biol Chem* **283** (21), 14295-14308 (2008).
6. Organization, W. H., World Health Statistics 2009 (2009).
7. Murphy, K., Travers, P. & Walport, M., *Janeway Immunologie*, 7th ed. (Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 2009).
8. Brennan, K. & Bowie, A. G., Activation of host pattern recognition receptors by viruses. *Curr Opin Microbiol* **13** (4), 503-507 (2010).
9. Rehwinkel, J. *et al.*, RIG-I detects viral genomic RNA during negative-strand RNA virus infection. *Cell* **140** (3), 397-408 (2010).
10. Kato, H. *et al.*, Length-dependent recognition of double-stranded ribonucleic acids by retinoic acid-inducible gene-I and melanoma differentiation-associated gene 5. *J Exp Med* **205** (7), 1601-1610 (2008).

11. Kawai, T. *et al.*, IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction. *Nat Immunol* **6** (10), 981-988 (2005).
12. Meylan, E. *et al.*, Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus. *Nature* **437** (7062), 1167-1172 (2005).
13. Seth, R. B., Sun, L., Ea, C.-K. & Chen, Z. J., Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF-kappaB and IRF 3. *Cell* **122** (5), 669-682 (2005).
14. Xu, L.-G. *et al.*, VISA is an adapter protein required for virus-triggered IFN-beta signaling. *Mol Cell* **19** (6), 727-740 (2005).
15. Saha, S. K. *et al.*, Regulation of antiviral responses by a direct and specific interaction between TRAF3 and Cardif. *EMBO J* **25** (14), 3257-3263 (2006).
16. Karin, M. & Ben-Neriah, Y., Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annu Rev Immunol* **18**, 621-663 (2000).
17. Fitzgerald, K. A. *et al.*, IKKepsilon and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway. *Nat Immunol* **4** (5), 491-496 (2003).
18. Akira, S. & Takeda, K., Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* **4** (7), 499-511 (2004).
19. Beutler, B., Innate immune responses to microbial poisons: discovery and function of the Toll-like receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **43**, 609-628 (2003).
20. Shi, Z. *et al.*, A novel Toll-like receptor that recognizes vesicular stomatitis virus. *J Biol Chem* **286** (6), 4517-4524 (2011).
21. Akira, S., Uematsu, S. & Takeuchi, O., Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* **124** (4), 783-801 (2006).
22. West, A. P., Koblansky, A. A. & Ghosh, S., Recognition and signaling by toll-like receptors. *Annu Rev Cell Dev Biol* **22**, 409-437 (2006).

-
23. ISAACS, A. & LINDENMANN, J., Virus interference. I. The interferon. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **147** (927), 258-267 (1957).
 24. Schlaak, J. F. *et al.*, Cell-type and donor-specific transcriptional responses to interferon-alpha. Use of customized gene arrays. *J Biol Chem* **277** (51), 49428-49437 (2002).
 25. Nadeau, J. H. *et al.*, Rearrangement of genes located on homologous chromosomal segments in mouse and man: the location of genes for alpha- and beta-interferon, alpha-1 acid glycoprotein-1 and -2, and aminolevulinate dehydratase on mouse chromosome 4. *Genetics* **114** (4), 1239-1255 (1986).
 26. Lanaya, H., Renauld, J.-C. & Michiels, T., Characterization of the murine alpha interferon gene family. *J Virol* **78** (15), 8219-8228 (2004).
 27. Barchet, W. *et al.*, Virus-induced interferon alpha production by a dendritic cell subset in the absence of feedback signaling in vivo. *J Exp Med* **195** (4), 507-516 (2002).
 28. Fitzgerald-Bocarsly, P., Natural interferon-alpha producing cells: the plasmacytoid dendritic cells. *Biotechniques Suppl*, 16--20, 22, 24-9 (2002).
 29. Colonna, M., Trinchieri, G. & Liu, Y.-J., Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nat Immunol* **5** (12), 1219-1226 (2004).
 30. Noppert, S. J., Fitzgerald, K. A. & Hertzog, P. J., The role of type I interferons in TLR responses. *Immunol Cell Biol* **85** (6), 446-457 (2007).
 31. Müller, U. *et al.*, Functional role of type I and type II interferons in antiviral defense. *Science* **264** (5167), 1918-1921 (1994).
 32. Hwang, S. Y. *et al.*, A null mutation in the gene encoding a type I interferon receptor component eliminates antiproliferative and antiviral responses to interferons alpha and beta and alters macrophage responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92** (24), 11284-11288 (1995).

33. Müller, U., Huang, S., Zinkernagel, R. M. & Aguet, M., Immune defence in mice lacking type I and/or type II interferon receptors. *Immunol Rev* **148**, 5-18 (1995).
34. Murray, P. J., The JAK-STAT signaling pathway: input and output integration. *J Immunol* **178** (5), 2623-2629 (2007).
35. Platanias, L. C. & Fish, E. N., Signaling pathways activated by interferons. *Exp Hematol* **27** (11), 1583-1592 (1999).
36. Parmar, S. & Platanias, L. C., Interferons: mechanisms of action and clinical applications. *Curr Opin Oncol* **15** (6), 431-439 (2003).
37. Stark, G. R., Kerr, I. M., Williams, B. R., Silverman, R. H. & Schreiber, R. D., How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem* **67**, 227-264 (1998).
38. Darnell, J. J., STATs and gene regulation. *Science* **277** (5332), 1630-1635 (1997).
39. Aaronson, D. S. & Horvath, C. M., A road map for those who don't know JAK-STAT. *Science* **296** (5573), 1653-1655 (2002).
40. Liew, F. Y., Xu, D., Brint, E. K. & O'Neill, L. A. J., Negative regulation of toll-like receptor-mediated immune responses. *Nat Rev Immunol* **5** (6), 446-458 (2005).
41. Marshak-Rothstein, A., Toll-like receptors in systemic autoimmune disease. *Nat Rev Immunol* **6** (11), 823-835 (2006).
42. Der, S. D., Zhou, A., Williams, B. R. & Silverman, R. H., Identification of genes differentially regulated by interferon alpha, beta, or gamma using oligonucleotide arrays. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95** (26), 15623-15628 (1998).
43. Samuel, C. E., Antiviral actions of interferons. *Clin Microbiol Rev* **14** (4), 778--809, table of contents (2001).
44. Chin, Y. E., Kitagawa, M., Kuida, K., Flavell, R. A. & Fu, X. Y., Activation of the STAT signaling pathway can cause expression of caspase 1 and apoptosis. *Mol Cell Biol* **17** (9), 5328-5337 (1997).
45. Kumar, A., Commane, M., Flickinger, T. W., Horvath, C. M. & Stark, G. R., Defective TNF-alpha-induced apoptosis in STAT1-null cells due to low constitutive levels of caspases. *Science* **278** (5343), 1630-1632 (1997).

-
46. Platanias, L. C., Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. *Nat Rev Immunol* **5** (5), 375-386 (2005).
 47. Billiau, A., Kieseier, B. C. & Hartung, H.-P., Biologic role of interferon beta in multiple sclerosis. *J Neurol* **251 Suppl 2**, II10--II14 (2004).
 48. Clanet, M., Kappos, L., Hartung, H. P., Hohlfeld, R. & European, I. F. N.-1. D.-C. S. I., Interferon beta-1a in relapsing multiple sclerosis: four-year extension of the European IFNbeta-1a Dose-Comparison Study. *Mult Scler* **10** (2), 139-144 (2004).
 49. Prinz, M. *et al.*, Innate immunity mediated by TLR9 modulates pathogenicity in an animal model of multiple sclerosis. *J Clin Invest* **116** (2), 456-464 (2006).
 50. Haller, O., Kochs, G. & Weber, F., The interferon response circuit: induction and suppression by pathogenic viruses. *Virology* **344** (1), 119-130 (2006).
 51. Sen, G. C., Viruses and interferons. *Annu Rev Microbiol* **55**, 255-281 (2001).
 52. Pestka, S., Langer, J. A., Zoon, K. C. & Samuel, C. E., Interferons and their actions. *Annu Rev Biochem* **56**, 727-777 (1987).
 53. Bach, E. A., Aguet, M. & Schreiber, R. D., The IFN gamma receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling. *Annu Rev Immunol* **15**, 563-591 (1997).
 54. Ikeda, H., Old, L. J. & Schreiber, R. D., The roles of IFN gamma in protection against tumor development and cancer immunoediting. *Cytokine Growth Factor Rev* **13** (2), 95-109 (2002).
 55. Dalton, D. K. *et al.*, Multiple defects of immune cell function in mice with disrupted interferon-gamma genes. *Science* **259** (5102), 1739-1742 (1993).
 56. Huang, S. *et al.*, Immune response in mice that lack the interferon-gamma receptor. *Science* **259** (5102), 1742-1745 (1993).

57. Ank, N. *et al.*, Lambda interferon (IFN-lambda), a type III IFN, is induced by viruses and IFNs and displays potent antiviral activity against select virus infections in vivo. *J Virol* **80** (9), 4501-4509 (2006).
58. Zhou, Z. *et al.*, Type III interferon (IFN) induces a type I IFN-like response in a restricted subset of cells through signaling pathways involving both the Jak-STAT pathway and the mitogen-activated protein kinases. *J Virol* **81** (14), 7749-7758 (2007).
59. Mamane, Y. *et al.*, Interferon regulatory factors: the next generation. *Gene* **237** (1), 1-14 (1999).
60. Taniguchi, T., Ogasawara, K., Takaoka, A. & Tanaka, N., IRF family of transcription factors as regulators of host defense. *Annu Rev Immunol* **19**, 623-655 (2001).
61. Darnell, J. J., Kerr, I. M. & Stark, G. R., Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* **264** (5164), 1415-1421 (1994).
62. Tamura, T., Yanai, H., Savitsky, D. & Taniguchi, T., The IRF family transcription factors in immunity and oncogenesis. *Annu Rev Immunol* **26**, 535-584 (2008).
63. Mancl, M. E. *et al.*, Two discrete promoters regulate the alternatively spliced human interferon regulatory factor-5 isoforms. Multiple isoforms with distinct cell type-specific expression, localization, regulation, and function. *J Biol Chem* **280** (22), 21078-21090 (2005).
64. Graham, R. R. *et al.*, A common haplotype of interferon regulatory factor 5 (IRF5) regulates splicing and expression and is associated with increased risk of systemic lupus erythematosus. *Nat Genet* **38** (5), 550-555 (2006).
65. Sigurdsson, S. *et al.*, Association of a haplotype in the promoter region of the interferon regulatory factor 5 gene with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* **56** (7), 2202-2210 (2007).

-
66. Dieguez-Gonzalez, R. *et al.*, Association of interferon regulatory factor 5 haplotypes, similar to that found in systemic lupus erythematosus, in a large subgroup of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* **58** (5), 1264-1274 (2008).
67. Han, S. W. *et al.*, Association of polymorphisms in interferon regulatory factor 5 gene with rheumatoid arthritis: a metaanalysis. *J Rheumatol* **36** (4), 693-697 (2009).
68. Miceli-Richard, C. *et al.*, Association of an IRF5 gene functional polymorphism with Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* **56** (12), 3989-3994 (2007).
69. Kristjansdottir, G. *et al.*, Interferon regulatory factor 5 (IRF5) gene variants are associated with multiple sclerosis in three distinct populations. *J Med Genet* **45** (6), 362-369 (2008).
70. Dideberg, V. *et al.*, An insertion-deletion polymorphism in the interferon regulatory Factor 5 (IRF5) gene confers risk of inflammatory bowel diseases. *Hum Mol Genet* **16** (24), 3008-3016 (2007).
71. Kozyrev, S. V. & Alarcon-Riquelme, M. E., The genetics and biology of Irf5-mediated signaling in lupus. *Autoimmunity* **40** (8), 591-601 (2007).
72. Paun, A., Bankoti, R., Joshi, T., Pitha, P. M. & Stäger, S., Critical role of IRF-5 in the development of T helper 1 responses to *Leishmania donovani* infection. *PLoS Pathog* **7** (1), e1001246 (2011).
73. Krausgruber, T. *et al.*, IRF5 promotes inflammatory macrophage polarization and TH1-TH17 responses. *Nat Immunol* **12** (3), 231-238 (2011).
74. Lien, C. *et al.*, Critical role of IRF-5 in regulation of B-cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107** (10), 4664-4668 (2010).
75. *et al.*, Functional classification of interferon-stimulated genes identified using microarrays. *J Leukoc Biol* **69** (6), 912-920 (2001).
76. Daffis, S. *et al.*, 2'-O methylation of the viral mRNA cap evades host restriction by IFIT family members. *Nature* **468** (7322), 452-456 (2010).
77. Fensterl, V. *et al.*, Interferon-Induced Ifit2/ISG54 Protects Mice from Lethal VSV Neuropathogenesis. *PLoS Pathog* **8** (5), e1002712 (2012).

78. Sadler, A. J. & G., B. R., Interferon-inducible antiviral effectors. *Nat Rev Immunol* **8** (7), 559-568 (2008).
79. Zhu, H., Cong, J. P. & Shenk, T., Use of differential display analysis to assess the effect of human cytomegalovirus infection on the accumulation of cellular RNAs: induction of interferon-responsive RNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94** (25), 13985-13990 (1997).
80. Olofsson, P. S. *et al.*, The antiviral cytomegalovirus inducible gene 5/viperin is expressed in atherosclerosis and regulated by proinflammatory agents. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **25** (7), e113--e116 (2005).
81. Severa, M., Coccia, E. M. & Fitzgerald, K. A., Toll-like receptor-dependent and -independent viperin gene expression and counter-regulation by PRDI-binding factor-1/BLIMP1. *J Biol Chem* **281** (36), 26188-26195 (2006).
82. Kato, H. *et al.*, Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature* **441** (7089), 101-105 (2006).
83. Chin, K. C. & Cresswell, P., Viperin (cig5), an IFN-inducible antiviral protein directly induced by human cytomegalovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98** (26), 15125-15130 (2001).
84. Sofia, H. J., Chen, G., Hetzler, B. G., Reyes-Spindola, J. F. & Miller, N. E., Radical SAM, a novel protein superfamily linking unresolved steps in familiar biosynthetic pathways with radical mechanisms: functional characterization using new analysis and information visualization methods. *Nucleic Acids Res* **29** (5), 1097-1106 (2001).

-
85. Duschene, K. S. & Broderick, J. B., The antiviral protein viperin is a radical SAM enzyme. *FEBS Lett* **584** (6), 1263-1267 (2010).
86. Shaveta, G., Shi, J., Chow, V. T. K. & Song, J., Structural characterization reveals that viperin is a radical S-adenosyl-L-methionine (SAM) enzyme. *Biochem Biophys Res Commun* **391** (3), 1390-1395 (2010).
87. Drin, G. *et al.*, A general amphipathic alpha-helical motif for sensing membrane curvature. *Nat Struct Mol Biol* **14** (2), 138-146 (2007).
88. Drin, G. & Antonny, B., Amphipathic helices and membrane curvature. *FEBS Lett* **584** (9), 1840-1847 (2010).
89. Hinson, E. R. & Cresswell, P., The antiviral protein, viperin, localizes to lipid droplets via its N-terminal amphipathic alpha-helix. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106** (48), 20452-20457 (2009).
90. Yamamoto, A., Masaki, R. & Tashiro, Y., Formation of crystalloid endoplasmic reticulum in COS cells upon overexpression of microsomal aldehyde dehydrogenase by cDNA transfection. *J Cell Sci* **109** (Pt 7), 1727-1738 (1996).
91. Zhang, Y., Burke, C. W., Ryman, K. D. & Klimstra, W. B., Identification and characterization of interferon-induced proteins that inhibit alphavirus replication. *J Virol* **81** (20), 11246-11255 (2007).
92. Jiang, D. *et al.*, Identification of three interferon-inducible cellular enzymes that inhibit the replication of hepatitis C virus. *J Virol* **82** (4), 1665-1678 (2008).
93. Jiang, D. *et al.*, Identification of five interferon-induced cellular proteins that inhibit west nile virus and dengue virus infections. *J Virol* **84** (16), 8332-8341 (2010).
94. Helbig, K. J., Lau, D. T.-Y., Semendric, L., Harley, H. A. J. & Beard, M. R., Analysis of ISG expression in chronic hepatitis C identifies viperin as a potential antiviral effector. *Hepatology* **42** (3), 702-710 (2005).
95. Wang, X., Hinson, E. R. & Cresswell, P., The interferon-inducible protein viperin inhibits influenza virus release by perturbing lipid rafts. *Cell Host Microbe* **2** (2), 96-105 (2007).

96. Rivieccio, M. A. *et al.*, TLR3 ligation activates an antiviral response in human fetal astrocytes: a role for viperin/cig5. *J Immunol* **177** (7), 4735-4741 (2006).
97. Nasr, N. *et al.*, HIV-1 infection of human macrophages directly induces viperin which inhibits viral production. *Blood* **120** (4), 778-788 (2012).
98. Stirnweiss, A. *et al.*, IFN regulatory factor-1 bypasses IFN-mediated antiviral effects through viperin gene induction. *J Immunol* **184** (9), 5179-5185 (2010).
99. Szretter, K. J. *et al.*, The interferon-inducible gene viperin restricts West Nile virus pathogenesis. *J Virol* **85** (22), 11557-11566 (2011).
100. Szkopińska, A. & Płochocka, D., Farnesyl diphosphate synthase; regulation of product specificity. *Acta Biochim Pol* **52** (1), 45-55 (2005).
101. Bavari, S. *et al.*, Lipid raft microdomains: a gateway for compartmentalized trafficking of Ebola and Marburg viruses. *J Exp Med* **195** (5), 593-602 (2002).
102. Nguyen, D. H. & Hildreth, J. E., Evidence for budding of human immunodeficiency virus type 1 selectively from glycolipid-enriched membrane lipid rafts. *J Virol* **74** (7), 3264-3272 (2000).
103. Brügger, B. *et al.*, The HIV lipidome: a raft with an unusual composition. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103** (8), 2641-2646 (2006).
104. Ono, A. & Freed, E. O., Role of lipid rafts in virus replication. *Adv Virus Res* **64**, 311-358 (2005).
105. Elazar, M. *et al.*, Amphipathic helix-dependent localization of NS5A mediates hepatitis C virus RNA replication. *J Virol* **77** (10), 6055-6061 (2003).
106. Fukasawa, M., Cellular lipid droplets and hepatitis C virus life cycle. *Biol Pharm Bull* **33** (3), 355-359 (2010).
107. Gao, L., Aizaki, H., He, J.-W. & Lai, M. M. C., Interactions between viral nonstructural proteins and host protein hVAP-33 mediate the formation of hepatitis C virus RNA replication complex on lipid raft. *J Virol* **78** (7), 3480-3488 (2004).
108. Wang, S. *et al.*, Viperin inhibits hepatitis C virus replication by interfering with binding of NS5A to host protein hVAP-33. *J Gen Virol* **93** (Pt 1), 83-92 (2012).

-
109. Samsa, M. M. *et al.*, Dengue virus capsid protein usurps lipid droplets for viral particle formation. *PLoS Pathog* **5** (10), e1000632 (2009).
110. Bowie, A. G. & Unterholzner, L., Viral evasion and subversion of pattern-recognition receptor signalling. *Nat Rev Immunol* **8** (12), 911-922 (2008).
111. Grandvaux, N. *et al.*, Transcriptional profiling of interferon regulatory factor 3 target genes: direct involvement in the regulation of interferon-stimulated genes. *J Virol* **76** (11), 5532-5539 (2002).
112. DeFilippis, V. R. *et al.*, Interferon regulatory factor 3 is necessary for induction of antiviral genes during human cytomegalovirus infection. *J Virol* **80** (2), 1032-1037 (2006).
113. Dixit, E. *et al.*, Peroxisomes are signaling platforms for antiviral innate immunity. *Cell* **141** (4), 668-681 (2010).
114. Hermanns, P. *et al.*, Consequences of mutations in the non-coding RMRP RNA in cartilage-hair hypoplasia. *Hum Mol Genet* **14** (23), 3723-3740 (2005).
115. Hinson, E. R. *et al.*, Viperin is highly induced in neutrophils and macrophages during acute and chronic lymphocytic choriomeningitis virus infection. *J Immunol* **184** (10), 5723-5731 (2010).
116. Fink, J. *et al.*, Host gene expression profiling of dengue virus infection in cell lines and patients. *PLoS Negl Trop Dis* **1** (2), e86 (2007).
117. Khaiboullina, S. F., Rizvanov, A. A., Holbrook, M. R. & , Yellow fever virus strains Asibi and 17D-204 infect human umbilical cord endothelial cells and induce novel changes in gene expression. *Virology* **342** (2), 167-176 (2005).
118. Chan, Y.-L., Chang, T.-H., Liao, C.-L. & Lin, Y.-L., The cellular antiviral protein viperin is attenuated by proteasome-mediated protein degradation in Japanese encephalitis virus-infected cells. *J Virol* **82** (21), 10455-10464 (2008).

119. Boehme, K. W., Singh, J., Perry, S. T. & Compton, T., Human cytomegalovirus elicits a coordinated cellular antiviral response via envelope glycoprotein B. *J Virol* **78** (3), 1202-1211 (2004).
120. Boudinot, P. *et al.*, Vesicular stomatitis virus and pseudorabies virus induce a *vig1/cig5* homologue in mouse dendritic cells via different pathways. *J Gen Virol* **81** (Pt 11), 2675-2682 (2000).
121. Proud, D. *et al.*, Gene expression profiles during in vivo human rhinovirus infection: insights into the host response. *Am J Respir Crit Care Med* **178** (9), 962-968 (2008).
122. White, L. K. *et al.*, Chikungunya virus induces IPS-1-dependent innate immune activation and protein kinase R-independent translational shutoff. *J Virol* **85** (1), 606-620 (2011).
123. Seo, J.-Y., Yaneva, R., Hinson, E. R. & Cresswell, P., Human cytomegalovirus directly induces the antiviral protein viperin to enhance infectivity. *Science* **332** (6033), 1093-1097 (2011).
124. Saitoh, T. *et al.*, Antiviral protein Viperin promotes Toll-like receptor 7- and Toll-like receptor 9-mediated type I interferon production in plasmacytoid dendritic cells. *Immunity* **34** (3), 352-363 (2011).
125. Hoek, R. M. *et al.*, Down-regulation of the macrophage lineage through interaction with OX2 (CD200). *Science* **290** (5497), 1768-1771 (2000).
126. Hart, D. N. & Fabre, J. W., Demonstration and characterization of Ia-positive dendritic cells in the interstitial connective tissues of rat heart and other tissues, but not brain. *J Exp Med* **154** (2), 347-361 (1981).
127. Perry, V. H., Hume, D. A. & Gordon, S., Immunohistochemical localization of macrophages and microglia in the adult and developing mouse brain. *Neuroscience* **15** (2), 313-326 (1985).

-
128. Prinz, M. & Mildner, A., Microglia in the CNS: immigrants from another world. *Glia* **59** (2), 177-187 (2011).
129. Guillemin, G. J. & Brew, B. J., Microglia, macrophages, perivascular macrophages, and pericytes: a review of function and identification. *J Leukoc Biol* **75** (3), 388-397 (2004).
130. McMenamin, P. G., Distribution and phenotype of dendritic cells and resident tissue macrophages in the dura mater, leptomeninges, and choroid plexus of the rat brain as demonstrated in wholemount preparations. *J Comp Neurol* **405** (4), 553-562 (1999).
131. Hickey, W. F., Basic principles of immunological surveillance of the normal central nervous system. *Glia* **36** (2), 118-124 (2001).
132. Delhaye, S. *et al.*, Neurons produce type I interferon during viral encephalitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103** (20), 7835-7840 (2006).
133. Sandberg, K., Eloranta, M. L. & Campbell, I. L., Expression of alpha/beta interferons (IFN-alpha/beta) and their relationship to IFN-alpha/beta-induced genes in lymphocytic choriomeningitis. *J Virol* **68** (11), 7358-7366 (1994).
134. Akwa, Y. *et al.*, Transgenic expression of IFN-alpha in the central nervous system of mice protects against lethal neurotropic viral infection but induces inflammation and neurodegeneration. *J Immunol* **161** (9), 5016-5026 (1998).
135. Chapman, G. A. *et al.*, Fractalkine cleavage from neuronal membranes represents an acute event in the inflammatory response to excitotoxic brain damage. *J Neurosci* **20** (15), RC87 (2000).
136. Griffin, D. E., Immune responses to RNA-virus infections of the CNS. *Nat Rev Immunol* **3** (6), 493-502 (2003).
137. Hooper, D. C. *et al.*, Collaboration of antibody and inflammation in clearance of rabies virus from the central nervous system. *J Virol* **72** (5), 3711-3719 (1998).
138. Tschen, S.-I. *et al.*, Recruitment kinetics and composition of antibody-secreting cells within the central nervous system following viral encephalomyelitis. *J Immunol* **168** (6), 2922-2929 (2002).

139. Tyor, W. R., Wesselingh, S., Levine, B. & Griffin, D. E., Long term intraparenchymal Ig secretion after acute viral encephalitis in mice. *J Immunol* **149** (12), 4016-4020 (1992).
140. Modrow, S., Falke, D. & Truyen, U., *Molekulare Virologie*, 2nd ed. (Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Berlin, 2003).
141. HANSON, R. P., RASMUSSEN, J. A., BRANDLY, C. A. & BROWN, J. W., Human infection with the virus of vesicular stomatitis. *J Lab Clin Med* **36** (5), 754-758 (1950).
142. Sabin, A. B. & Olitsky, P. K., INFLUENCE OF HOST FACTORS ON NEUROINVASIVENESS OF VESICULAR STOMATITIS VIRUS : I. EFFECT OF AGE ON THE INVASION OF THE BRAIN BY VIRUS INSTILLED IN THE NOSE. *J Exp Med* **66** (1), 15-34 (1937).
143. Dalton, K. P. & Rose, J. K., Relative neurotropism of a recombinant rhabdovirus expressing a green fluorescent envelope glycoprotein. *J Virol* **76** (3), 1309-1327 (2002).
144. Plakhov, I. V., Arlund, E. E., Aoki, C. & Reiss, C. S., The earliest events in vesicular stomatitis virus infection of the murine olfactory neuroepithelium and entry of the central nervous system. *Virology* **209** (1), 257-262 (1995).
145. Reiss, C. S., Plakhov, I. V. & Komatsu, T., Viral replication in olfactory receptor neurons and entry into the olfactory bulb and brain. *Ann N Y Acad Sci* **855**, 751-761 (1998).
146. Gresser, I., Tovey, M. G. & Bourali-Maury, C., Efficacy of exogenous interferon treatment initiated after onset of multiplication of vesicular stomatitis virus in the brains of mice. *J Gen Virol* **27** (3), 395-398 (1975).
147. Meier, E., Kunz, G., Haller, O. & Arnheiter, H., Activity of rat Mx proteins against a rhabdovirus. *J Virol* **64** (12), 6263-6269 (1990).
148. Espert, L. *et al.*, ISG20, a new interferon-induced RNase specific for single-stranded RNA, defines an alternative antiviral pathway against RNA genomic viruses. *J Biol Chem* **278** (18), 16151-16158 (2003).

-
149. Rieder, M. & Conzelmann, K.-K., Rhabdovirus evasion of the interferon system. *J Interferon Cytokine Res* **29** (9), 499-509 (2009).
150. Faul, E. J., Lyles, D. S. & Schnell, M. J., Interferon response and viral evasion by members of the family rhabdoviridae. *Viruses* **1** (3), 832-851 (2009).
151. Bi, Z. & Reiss, C. S., Inhibition of vesicular stomatitis virus infection by nitric oxide. *J Virol* **69** (4), 2208-2213 (1995).
152. Komatsu, T., Bi, Z. & Reiss, C. S., Interferon-gamma induced type I nitric oxide synthase activity inhibits viral replication in neurons. *J Neuroimmunol* **68** (1-2), 101-108 (1996).
153. Bründler, M. A. *et al.*, Immunity to viruses in B cell-deficient mice: influence of antibodies on virus persistence and on T cell memory. *Eur J Immunol* **26** (9), 2257-2262 (1996).
154. Moseman, E. A. *et al.*, B cell maintenance of subcapsular sinus macrophages protects against a fatal viral infection independent of adaptive immunity. *Immunity* **36** (3), 415-426 (2012).
155. Iannaccone, M. *et al.*, Subcapsular sinus macrophages prevent CNS invasion on peripheral infection with a neurotropic virus. *Nature* **465** (7301), 1079-1083 (2010).
156. Yang, X. W., Model, P. & Heintz, N., Homologous recombination based modification in Escherichia coli and germline transmission in transgenic mice of a bacterial artificial chromosome. *Nat Biotechnol* **15** (9), 859-865 (1997).
157. Shizuya, H. *et al.*, Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in Escherichia coli using an F-factor-based vector. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89** (18), 8794-8797 (1992).
158. Datsenko, K. A. & Wanner, B. L., One-step inactivation of chromosomal genes in Escherichia coli K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97** (12), 6640-6645 (2000).
159. Giraldo, P. & Montoliu, L., Size matters: use of YACs, BACs and PACs in transgenic animals. *Transgenic Res* **10** (2), 83-103 (2001).

160. Robanus-Maandag, E. *et al.*, p107 is a suppressor of retinoblastoma development in pRb-deficient mice. *Genes Dev* **12** (11), 1599-1609 (1998).
161. Letchworth, G. J., Rodriguez, L. L. & , Vesicular stomatitis. *Vet J* **157** (3), 239-260 (1999).
162. Huneycutt, B. S., Bi, Z., Aoki, C. J. & Reiss, C. S., Central neuropathogenesis of vesicular stomatitis virus infection of immunodeficient mice. *J Virol* **67** (11), 6698-6706 (1993).
163. Huneycutt, B. S. *et al.*, Distribution of vesicular stomatitis virus proteins in the brains of BALB/c mice following intranasal inoculation: an immunohistochemical analysis. *Brain Res* **635** (1-2), 81-95 (1994).
164. Boritz, E., Gerlach, J., Johnson, J. E. & Rose, J. K., Replication-competent rhabdoviruses with human immunodeficiency virus type 1 coats and green fluorescent protein: entry by a pH-independent pathway. *J Virol* **73** (8), 6937-6945 (1999).
165. Scholübbbers, L., Interferonsysteme und deren Abwehrreaktionen gegen Vesicular Stomatitis Viren in Fibroblasten. *Bachelorarbeit* (2011).
166. Knop, L., Einfluss von Interferon-regulierenden Faktoren auf die antivirale Abwehr. *Bachelorarbeit* (2012).
167. Charan, S. & Zinkernagel, R. M., Antibody mediated suppression of secondary IgM response in nude mice against vesicular stomatitis virus. *J Immunol* **136** (8), 3057-3061 (1986).
168. Bachmann, M. F., Hengartner, H. & Zinkernagel, R. M., T helper cell-independent neutralizing B cell response against vesicular stomatitis virus: role of antigen patterns in B cell induction? *Eur J Immunol* **25** (12), 3445-3451 (1995).

-
169. Gobet, R., Cerny, A., Rüedi, E., Hengartner, H. & Zinkernagel, R. M., The role of antibodies in natural and acquired resistance of mice to vesicular stomatitis virus. *Exp Cell Biol* **56** (4), 175-180 (1988).
170. Schoenemeyer, A. *et al.*, The interferon regulatory factor, IRF5, is a central mediator of toll-like receptor 7 signaling. *J Biol Chem* **280** (17), 17005-17012 (2005).
171. Qiu, L.-Q., Cresswell, P. & Chin, K.-C., Viperin is required for optimal Th2 responses and T-cell receptor-mediated activation of NF-kappaB and AP-1. *Blood* **113** (15), 3520-3529 (2009).
172. Shcherbo, D. *et al.*, Bright far-red fluorescent protein for whole-body imaging. *Nat Methods* **4** (9), 741-746 (2007).
173. Detje, C. N. *et al.*, Local type I IFN receptor signaling protects against virus spread within the central nervous system. *J Immunol* **182** (4), 2297-2304 (2009).
174. Belkowski, L. S. & Sen, G. C., Inhibition of vesicular stomatitis viral mRNA synthesis by interferons. *J Virol* **61** (3), 653-660 (1987).
175. Christian, A. Y., Barna, M., Bi, Z. & Reiss, C. S., Host immune response to vesicular stomatitis virus infection of the central nervous system in C57BL/6 mice. *Viral Immunol* **9** (3), 195-205 (1996).
176. Bi, Z., Barna, M., Komatsu, T. & Reiss, C. S., Vesicular stomatitis virus infection of the central nervous system activates both innate and acquired immunity. *J Virol* **69** (10), 6466-6472 (1995).
177. Fang, C.-M. *et al.*, Unique contribution of IRF-5-Ikaros axis to the B-cell IgG2a response. *Genes Immun* (2012).
178. Zirger, J. M. *et al.*, Rapid upregulation of interferon-regulated and chemokine mRNAs upon injection of 10⁸ international units, but not lower doses, of adenoviral vectors into the brain. *J Virol* **80** (11), 5655-5659 (2006).
179. Nansen, A., Marker, O., Bartholdy, C. & Thomsen, A. R., CCR2⁺ and CCR5⁺ CD8⁺ T cells increase during viral infection and migrate to sites of infection. *Eur J Immunol* **30** (7), 1797-1806 (2000).

180. Irani, D. N. & Griffin, D. E., Regulation of lymphocyte homing into the brain during viral encephalitis at various stages of infection. *J Immunol* **156** (10), 3850-3857 (1996).
181. Purtha, W. E., Swiecki, M., Colonna, M., Diamond, M. S. & Bhattacharya, D., Spontaneous mutation of the Dock2 gene in Irf5^{-/-} mice complicates interpretation of type I interferon production and antibody responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109** (15), E898--E904 (2012).
182. Reif, K. & Cyster, J., The CDM protein DOCK2 in lymphocyte migration. *Trends Cell Biol* **12** (8), 368-373 (2002).
183. Fukui, Y. *et al.*, Haematopoietic cell-specific CDM family protein DOCK2 is essential for lymphocyte migration. *Nature* **412** (6849), 826-831 (2001).
184. Gotoh, K. *et al.*, Differential requirement for DOCK2 in migration of plasmacytoid dendritic cells versus myeloid dendritic cells. *Blood* **111** (6), 2973-2976 (2008).
185. Nombela-Arrieta, C. *et al.*, Differential requirements for DOCK2 and phosphoinositide-3-kinase gamma during T and B lymphocyte homing. *Immunity* **21** (3), 429-441 (2004).
186. Nombela-Arrieta, C. *et al.*, A central role for DOCK2 during interstitial lymphocyte motility and sphingosine-1-phosphate-mediated egress. *J Exp Med* **204** (3), 497-510 (2007).
187. Kunisaki, Y. *et al.*, DOCK2 is a Rac activator that regulates motility and polarity during neutrophil chemotaxis. *J Cell Biol* **174** (5), 647-652 (2006).
188. Shulman, Z. *et al.*, DOCK2 regulates chemokine-triggered lateral lymphocyte motility but not transendothelial migration. *Blood* **108** (7), 2150-2158 (2006).
189. Nishikimi, A. *et al.*, Sequential regulation of DOCK2 dynamics by two phospholipids during neutrophil chemotaxis. *Science* **324** (5925), 384-387 (2009).

-
190. Gotoh, K. *et al.*, Selective control of type I IFN induction by the Rac activator DOCK2 during TLR-mediated plasmacytoid dendritic cell activation. *J Exp Med* **207** (4), 721-730 (2010).
191. Negishi, H. *et al.*, Cross-interference of RLR and TLR signaling pathways modulates antibacterial T cell responses. *Nat Immunol* **13** (7), 659-666 (2012).
192. Jensen, S. & Thomsen, A. R., Sensing of RNA viruses: a review of innate immune receptors involved in recognizing RNA virus invasion. *J Virol* **86** (6), 2900-2910 (2012).
193. Keating, S. E., Baran, M. & Bowie, A. G., Cytosolic DNA sensors regulating type I interferon induction. *Trends Immunol* **32** (12), 574-581 (2011).
194. Yang, P. *et al.*, The cytosolic nucleic acid sensor LRRFIP1 mediates the production of type I interferon via a beta-catenin-dependent pathway. *Nat Immunol* **11** (6), 487-494 (2010).
195. Komuro, K., Itakura, K., Boyse, A. & John, M., Ly-5: a new lymphocyte antigen system. *Immunogenetics* (1), 452-456 (1975).
196. Lund, J. M. *et al.*, Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101** (15), 5598-5603 (2004).
197. Chomczynski, P. & Sacchi, N., Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162** (1), 156-159 (1987).
198. Hooper, M., Hardy, K., Handyside, A., Hunter, S. & Monk, M., HPRT-deficient (Lesch-Nyhan) mouse embryos derived from germline colonization by cultured cells. *Nature* **326** (6110), 292-295 (1987).
199. Dinter, H. & Hauser, H., Cooperative interaction of multiple DNA elements in the human interferon-beta promoter. *Eur J Biochem* **166** (1), 103-109 (1987).
200. Pulverer, J. E. *et al.*, Temporal and spatial resolution of type I and III interferon responses in vivo. *J Virol* **84** (17), 8626-8638 (2010).

201. Szretter, K. J. *et al.*, The immune adaptor molecule SARM modulates tumor necrosis factor alpha production and microglia activation in the brainstem and restricts West Nile Virus pathogenesis. *J Virol* **83** (18), 9329-9338 (2009).
202. Prof. Dr. Kaufmann, S. H. E. & Sütterlin, S., Berliner Institut für Bevölkerung und Entwicklung, Available at <http://www.berlin-institut.org/online-handbuchdemografie/entwicklungspolitik/infektionskrankheiten.html>.
203. Mattijssen, S. & Pruijn, G. J. M., Viperin, a key player in the antiviral response. *Microbes Infect* **14** (5), 419-426 (2012).
204. Detje, C. N., Zur Rolle der Typ I Interferone in der Abwehr von viralen Infektionen des zentralen Nervensystems. *Dissertation* (2007).

7 Appendix

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Erkennung von Viren mit RNA-Genom (adaptiert nach 62, 166).....	5
Abb. 2: Interferon-Rezeptor-Signalkaskade (adaptiert nach 78)	7
Abb. 3: Schematische Darstellung der Viperin-Struktur (adaptiert nach 203).....	13
Abb. 4: Übersicht über die antiviralen Wirkungen von Viperin (adaptiert nach 203) ...	14
Abb. 5: Aufbau des VSV-Partikels (adaptiert 140)	23
Abb. 6: Schematische Darstellung der BAC-Recombineering-Strategie	28
Abb. 7: Der BAC-Reporter ist durch Typ I IFN induzierbar.....	29
Abb. 8: Charakterisierung der mES-Zellklone nach homologer Rekombination.....	30
Abb. 9: Chimäre Mäuse	31
Abb. 10: Genotypisierung der F1-/F2-Generation.....	32
Abb. 11: Charakterisierung der transgenen Mäuse der F2 Generation.....	33
Abb. 12: IRF5 schützt Mäuse vor einer tödlich verlaufenden intranasalen VSV- Infektion	35
Abb. 13: IRF5 schützt Mäuse vor einer tödlich verlaufenden intraperitonealen LGTV- Infektion	36
Abb. 14: IRF5 inhibiert die Replikation von VSV	38
Abb. 15: VSV-GFP ist nicht so virulent wie VSV	39
Abb. 16: Der Verlust von IRF5 hat keinen Einfluss auf den Zelltropismus von VSV ...	40
Abb. 17: IRF5 ^{-/-} Tiere produzieren geringere Mengen an IFN α nach i.n. VSV-Infektion	41
Abb. 18: Expression von ISGs nach VSV-Infektion im Gehirn.....	43
Abb. 19: Expression von ISGs nach VSV-Infektion in der Lunge.....	44
Abb. 20: Expression von ISGs in MEFs (nach 165).....	45
Abb. 21: Bestimmung der Replikation von VSV in IRF5 ^{-/-} MEFs und Makrophagen (nach 166)	46
Abb. 22: Zusammensetzung der Immunzellen in der Milz nach VSV-Infektion.....	48
Abb. 23: Zusammensetzung der Immunzellen in der Lunge nach VSV-Infektion	48
Abb. 24: Zusammensetzung der Immunzellen im Gehirn nach VSV-Infektion	49

Abb. 25: IRF5 ^{-/-} Mäuse zeigen einen Defekt in der humoralen Immunantwort	51
Abb. 26: Die verringerte Menge VSV-neutralisierender Antikörper in IRF5 ^{-/-} Mäusen ist nicht ursprünglich für die Suszeptibilität gegenüber VSV-Infektionen	52
Abb. 27: B-Zellen aus IRF5 ^{-/-} Mäusen exprimieren mehr TNF β -mRNA als Wildtyp-B- Zellen.....	54
Abb. 28: IRF5 schützt Mäuse nicht einer tödlich verlaufenden intracerebralen VSV- Infektion	55
Abb. 29: TLR7 ist für die Bekämpfung einer VSV-Infektion nicht notwendig	56
Abb. 30: TLR7 ^{-/-} Mäuse sind wie C57Bl/6 Mäuse in der Lage VSV im gesamten Organismus zu eliminieren.....	57

Abkürzungsverzeichnis

5'PPP	5'-Triphosphat
Abb.	Abbildung
AP-1	<i>activating protein-1</i>
APC	<i>antigen-presenting cell</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BAC	<i>bacterial artificial chromosome</i>
BHK	<i>baby hamster kidney cell</i>
Bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serumalbumin
CARD	<i>caspase activation and recruitment domains</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CHIKV	Chikungunyavirus
C-Terminus	Carboxy-Terminus
DC	<i>dendritic cell</i>
dCTP	2'Desoxycytosin-5'-triphosphat
DENV	Denguevirus
DEPC	Diethylpyrocarbonat
d.h.	das heißt
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	2'Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
ds	<i>double-stranded</i>
DTT	Dithiothreitol

EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ER	endoplasmatisches Retikulum
FACS	fluorescence activated cell sorting
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FPPS	Farnesylidiphosphatsynthase
FRT	<i>Flp-recombinase targets</i>
g	Gramm
GAS	<i>IFNγ activated sites</i>
h	Stunde
HCMV	Humanes Cytomegalievirus
HCV	Hepatitis-C-Virus
HEPES	<i>4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid</i>
HIV	humane Immundefizienzvirus
i.c.	intracerebral
Ifit	<i>IFN-induced proteins with tetratricopeptide repeats</i>
IFN	Interferon
IFNAR	IFN- α -Rezeptor
IFNGR	IFN- γ -Rezeptor
IFNLR1	IFN- λ 1-Rezeptor
Ig	Immunglobulin
I κ B	<i>inhibitor of NFκ-B</i>
IKK	I κ B Kinase
IL	Interleukin
i.n.	intranasal
iNOS	<i>inducible nitric oxide synthase</i>
i.p.	intraperitoneal

IPS-1	<i>IFNβ promoter stimulator 1</i>
IRAK	<i>interleukin-1 receptor-associated kinase</i>
IRF	IFN-regulierender Faktor
ISG	IFN-stimuliertes Gen
ISG15	IFN-stimuliertes Gen mit 15 kDa
ISGF3	IFN-stimulierenden Genfaktor 3
ISRE	<i>interferon stimulated response element</i>
i.v	intravenös
JAK	Januskinase
JEV	Japanische-Enzephalitis-Virus
k	Kilo-
LPS	Lipopolysaccharide
m	Milli-
μ	Micro-
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MDA5	<i>melanoma differentiation-associated gene 5</i>
MEF	murine embryonale Fibroblasten
mES	murine embryonale Stammzellen
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
Mx2	Myxovirus-Resistenzgen 2
MyD88	<i>myeloid differentiation primary response gene 88</i>
NDV	<i>Newcastle Disease Virus</i>
NF κ -B	<i>nuclear factor κB</i>
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
NO	Stickstoffmonoxid
NS	nichtstrukturelles Protein

N-Terminus	Amino-Terminus
ntpII	Neomycin-Phosphotransferease-Gen
Nup 98	<i>Nucleopore of 98 kDa</i>
ORN	olfaktorische Rezeptorneuronen
PAMP	<i>pathogen-associated molecular pattern</i>
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
pDC	plasmacytoid dendritic cell
PFA	Paraformaldehyd
pfu	<i>plaque forming unit</i>
PGK	Phosphoglycerat-Kinase
PI3K	<i>phosphatidylinositol 3-kinases</i>
PKR	Proteinkinase R
PRR	<i>pattern recognition receptor</i>
Rae 1	<i>nucleoporins mRNA export factor 1</i>
RIG-I	<i>retinoic-acid-inducible gene</i>
RLR	<i>RIG-I-like receptors</i>
RNA	Ribonukleinsäure
Rsad2	<i>radical SAM domain-containing 2</i>
RT	Reverse Transkriptase
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SINV	Sindbisvirus
SLE	systemischen Lupus erythematodes
SPF	spezifisch pathogenfrei
ss	<i>single-stranded</i>
STAT	signal transducers and activators of transcription
SV	Sendaivirus

TBK1	<i>TRAF family member-associated NF-κB activator-binding kinase 1</i>
TEP	Trypsin EDTA
TIM	<i>TRAF-interacting motif</i>
TIR	<i>Toll/Interleukin-1 receptor</i>
TIRAP	<i>TIR domain containing adaptor protein</i>
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TNF	<i>tumor necrosis factor</i>
TNF β	Lymphotoxin $\alpha 1\beta 2$
TRAF	<i>TNF receptor-associated factor</i>
TRIF	<i>TIR-domain-containing adapter-inducing IFNβ</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TYK	Tyrosinkinase
vgl.	vergleiche
VSV	Vesikuläres-Stomatitis-Virus
WNV	West-Nil-Virus
x g	x-fache Erdbeschleunigung
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Virale Antigenerkennung durch Toll-ähnliche Rezeptoren (nach 21, 22)	4
Tabelle 2: Interferon-abhängige und unabhängige Induktion von Viperin durch Viren	16
Tabelle 3: Übersicht über die Eigenschaften der durch Blastozysteninjektion generierten Chimäre	32
Tabelle 4: Übersicht verwendeter Geräte	73
Tabelle 5: Übersicht verwendeter Mauslinien	76
Tabelle 6: Übersicht verwendeter Oligonukleotide	86
Tabelle 7: Übersicht verwendeter Oligonukleotide für die real-time PCR	88
Tabelle 8: Übersicht verwendeter Zelllinien	91
Tabelle 9: Übersicht verwendeter Antikörper für Durchflusszytometrie und Zellsortierung.	96
Tabelle 10: Übersicht verwendeter Antikörper für Histologie	101

Danksagung

Hiermit möchte ich allen Menschen danken, die an der erfolgreichen Entstehung dieser Dissertation beteiligt waren und mich in den letzten Jahren direkt und indirekt unterstützt haben.

Dr. Hansjörg Hauser möchte ich dafür danken, dass er mir ermöglichte diese Arbeit in der Arbeitsgruppe Genregulation und Differenzierung des Helmholtz Zentrum für Infektionsforschung Braunschweig anzufertigen.

Bei Dr. Andrea Kröger möchte ich mich für die Betreuung meiner Doktorarbeit, die vielen Vorschläge, Hinweise und Diskussionen bedanken.

Ich danke den Mitgliedern meines Thesis Committee Prof. Dunja Bruder, Dr. Stefan Lienenklaus und Dr. Hansjörg Hauser für wertvolle Anregungen und Hinweise.

Ich bedanke mich bei Frau Dr. Sabine Kirchhoff und ihrem Team der Helmholtz Graduiertenschule für Infektionsforschung. Die Graduate School hat die letzten drei Jahre für mich zusätzlich lehrreich und anspruchsvoll gemacht und stellte eine exzellente Struktur für Austausch und Aktivitäten bereit.

Des Weiteren möchte ich PD Dr. Gerhard Gross für die Übernahme der Mentorenschaft und Beurteilung dieser Doktorarbeit recht herzlich danken. Auch bei Prof. Dr. Michael Steinert möchte ich mich für das Koreferat bedanken und dafür, dass er zusammen mit PD Dr. Gerhard Gross die Arbeit vor der Fakultät für Lebenswissenschaften der Technischen Universität Braunschweig vertritt. Prof. Dr. Dunja Bruder und Prof. Dr. Ralf-Rainer Mendel danke ich für ihre Bereitschaft zur Teilnahme an der Prüfungskommission.

Großer Dank gebührt allen Mitarbeitern der tierexperimentellen Einheit des Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung für ihre Unterstützung - allen voran den „Müttern“ meiner Mäuse Denise Fortuné-Hernandez, Eva Jung und Karina Watzke.

Ich danke der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Swen Hülsmann aus der Abteilung Neurophysiologie und Zelluläre Biophysik der Universitätsmedizin Göttingen, insbesondere Dr. Christian Schnell für die tatkräftige Unterstützung bei den histologischen Analysen.

Ich möchte ganz RDIF, MSYS und MOLI für eine schöne Zeit in einem inspirierendem Arbeitsumfeld danken. Vor allem Danke ich dem Exil – Mario Köster, Maren Freund, Lukas Kemper, Ulfert Rand, Johannes Schwerk, Danim Shin und Markus Wolfsmüller für die Diskussionsbereitschaft, nicht enden wollende Mittwochnachmittage, spannende Photoshop-Schlachten und vielem mehr.

Außerdem möchte ich allen Amazonen des Labors D2.44 für die nette Zusammenarbeit danken. Vor allem danke ich Nicole Hänsgen, Laura Knop, Sharmila Nair, Ramya Nandakumar, Linda Scholübbbers und Dr. Elvira Weber (Amazone ehrenhalber). Mein besonderer Dank geht an Martina Grashoff, die einem immer mit praktischen Tipps, Lebensweisheiten oder einem offenen Ohr während eines Blitzkaffees zur Seite stand.

Für die besonders wichtige Unterstützung außerhalb des Labors danke ich meiner Familie, insbesondere meinen Eltern und Großeltern. Ausdrücklich danke ich Sandra, der besten Schwester der Welt fürs Korrekturlesen, stundenlange Telefonfürsorge, unzähligen Motivationskarten und lebenserhaltenden Ostpaketen.

Zuletzt, aber dennoch allen voran, möchte ich Christian für seine Liebe und Unterstützung danken. Danke für allabendliche Telefonate, tapferen Beistand an Wochenenddiensten, dem heldenhaften Ertragen meiner Launen und allem anderen.